SERGE WEINMAN

TOUTE LA BIOCHIMIE

TOUTE LA BIOCHIMIE

Serge Weinman

Professeur émérite
à la Faculté de médecine Saint-Antoine, Paris.
Ancien chef de service de biochimie
et de biologie moléculaire de l'hôpital Rothschild, Paris

Pierre Méhul

Illustrateur

Table des matières

PARTIE II

CATALYSE BIOLOGIQUE : STRUCTURE ET MÉCANISME D'ACTION DES ENZYMES

PARTIE III

ÉNERGIE CELLULAIRE CONVERSION ET MISE EN RÉSERVE

Partie IV

SYNTHÈSE DES BIOMOLÉCULES

PARTIE V

BIOMOLÉCULES ET ENVIRONNEMENT

Introduction

Lors du processus de création et d'expansion de l'Univers qui évolue depuis environ quinze milliards d'années, deux événements nous concernant plus directement sont survenus : l'organisation du système solaire avec la formation de notre planète, la Terre, il y a quatre milliards et demi d'années et l'apparition de ce qu'il est convenu d'appeler la vie, il y a quatre milliards d'années.

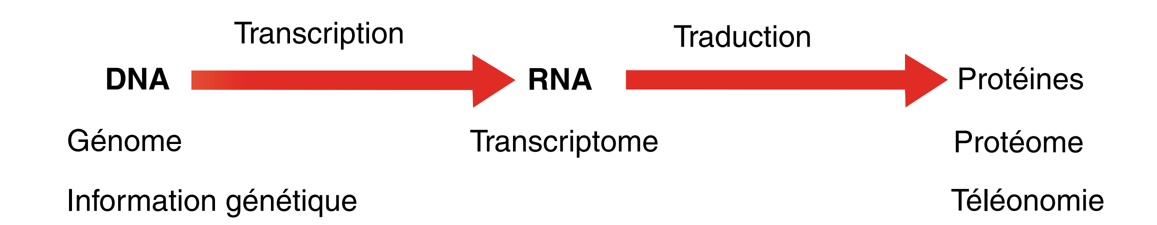
Mais, qu'est la vie ? Bien qu'il n'y ait pas de réponse à cette question, on peut cependant considérer qu'un être vivant, s'il se présente comme un ensemble constitué d'atomes régi par les lois universelles de la physique, est en fait, au sein de son environnement terrestre, un système susceptible de se suffire à lui-même et de subir l'évolution darwinienne. Il peut, en effet, de façon autonome, se procurer les éléments dont il a besoin pour s'auto-construire et obtenir l'énergie nécessaire à son fonctionnement. Il est aussi capable de se reproduire par formation de copies identiques à lui-même, sauf dans quelques rares cas où apparaissent des variations qu'une sélection naturelle rejettera ou adoptera. Ces deux considérations, très synthétiques, résultent d'études biochimiques conduites, pour l'essentiel, au XXe siècle.

La biochimie a analysé les constituants des cellules et étudié les réactions qui s'effectuent au sein de ces dernières. Il est ainsi apparu que toutes les cellules, délimitées par des membranes phospholipidiques, étaient constituées essentiellement de macromolécules de deux types, les protéines, éventuellement associées à des glucides, et les acides nucléiques, elles-mêmes formées par polymérisation de modules relativement simples, les aminoacides et les nucléotides, respectivement, tous susceptibles d'être intégralement synthétisés en laboratoire.

Les protéines, qui constituent le protéome, sont en fait responsables de toutes les « performances téléonomiques des êtres vivants » (Jacques Monod, *Le Hasard et la Nécessité*, 1970), y compris la catalyse par des enzymes de tout le réseau des réactions qui assument la transformation des biomolécules et la transduction de l'énergie.

L'acide désoxyribonucléique (DNA), qui constitue le génome, contient l'ensemble de l'information génétique. Cette dernière est tout d'abord transcrite en acides ribonucléiques messagers (mRNA) avant d'être traduite en protéines grâce à l'action conjuguée des acides ribonucléiques de transfert (tRNA) et des acides ribonucléiques ribosomiques (rRNA) ; les mRNA, les tRNA et les rRNA constituent ensemble le transcriptome. Par ailleurs, le DNA est susceptible de se répliquer et d'être transmis, inchangé, ou parfois muté, ou parfois recombiné, d'une cellule mère à ses cellules filles.

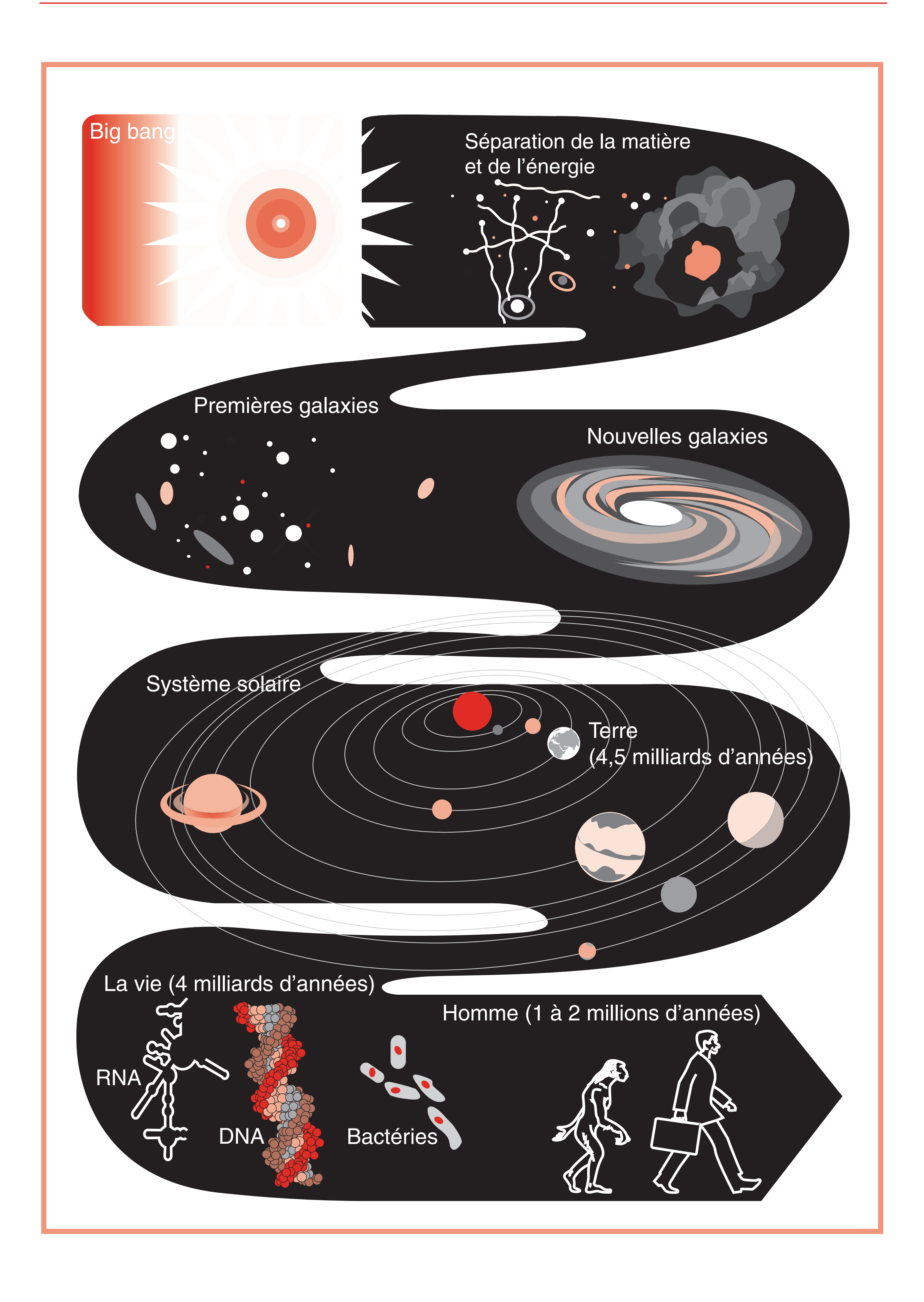
Le schéma de l'évolution des réactions qui s'effectuent chez un être vivant s'établit donc ainsi :



Sur ce solide fond de connaissances apportées par la biochimie, la génétique a pu établir que des segments de DNA, les gènes, sont au cœur de tous les événements cellulaires, puis la biologie moléculaire a su montrer que toutes les propriétés, héréditaires ou téléonomiques, des êtres vivants s'expliquent par la structure et les interactions des biomolécules qui constituent ces derniers.

La biochimie a aussi montré l'unité de structure et de fonction sous-jacente à la diversité biologique du monde vivant. L'utilisation du DNA par tous les êtres vivants et l'universalité du code génétique sont à la base de la constatation selon laquelle tous les organismes actuels apparaissent remarquablement uniformes au niveau moléculaire et ne se distinguent que par des variations somme toute relativement mineures. Cette notion implique aussi qu'ils viennent tous d'un ancêtre commun et que la diversité de la vie dans le monde moderne résulte de processus évolutifs opérant sur des processus fondamentaux. Bien plus que les mutations éventuelles, c'est une combinatoire d'un nombre limité de segments d'ADN qui produit l'énorme variété des structures formant les principaux constituants cellulaires. L'évolution biochimique est donc due avant tout à la duplication de gènes et à leur réassortiment ; la constitution en mosaïque des gènes et la structure en domaines des protéines qui s'ensuit donne à ces dernières des possibilités d'interactions multiples, accrues encore par la possibilité de formation de complexes multiprotéiques parfois très volumineux.

Ces étonnantes conquêtes de la biochimie sont actuellement présentées dans nombre de traités très complets, mais un guide permettant d'en revoir rapidement l'essentiel peut être aussi un instrument de travail utile pour l'étudiant. Ce livre a été conçu pour répondre à ce besoin ; abondamment illustré, il apporte une vue d'ensemble des principaux concepts de la biochimie et, bien que rédigé sous une forme concise, chaque chapitre tente d'en présenter les fondements en prenant en compte les découvertes les plus récentes.


Big bang
Séparation de la matière
et de l'énergie
Premières galaxies
Nouvelles galaxies
Système solaire
Terre
(4,5 milliards d'années)
La vie (4 milliards d'années)
Homme (1 à 2 millions d'années)
RNA
DNA
Bactéries

Le livre comprend cinq parties.

- La Partie I : «Architecture et logique moléculaires des êtres vivants» est une présentation de la structure et des propriétés des classes de biomolécules les plus importantes : protéines, modules fondamentaux des êtres vivants, acides nucléiques, porteurs de l'information génétique, glucides et lipides, réserves d'énergie mais aussi éléments structuraux.
- La Partie II : «Catalyse biologique : structure et mécanisme d'action des enzymes» est consacrée aux processus qui permettent la mise en œuvre du vaste réseau de réactions assurant l'édification des structures des cellules et la production d'énergie utilisable par ces dernières.
- La Partie III : «Énergie cellulaire, conversion et mise en réserve» traite de la création de l'ATP par phosphorylation oxydative ou photosynthèse. L'interconversion des différentes formes de l'énergie métabolique et les réactions de voies telles que la glycolyse et la gluconéogenèse, la β-oxydation et la biosynthèse des acides gras, le métabolisme des aminoacides, le cycle de l'acide citrique, la voie des pentoses phosphate sont discutées en fonction de mécanismes enzymatiques établis. Un dernier chapitre étudie certains aspects de la régulation et de l'intégration du métabolisme énergétique.
- La Partie IV : «Synthèse des biomolécules» couvre la biosynthèse des aminoacides, des nucléotides, des lipides membranaires, des stérols et des stéroïdes, la réplication du DNA, la synthèse du RNA et son épissage, la synthèse des protéines.
- La Partie V : «Biomolécules et environnement» montre comment les cellules répondent ou s'adaptent aux changements environnementaux. En particulier, les molécules qui assument les réponses du système immunitaire illustrent la façon dont ce processus de défense est intégré dans les organismes multicellulaires.

PARTIE I

ARCHITECTURE ET LOGIQUE DES ÊTRES VIVANTS STRUCTURE DES BIOMOLÉCULES

La vie est la manifestation de l'une des nombreuses organisations de la matière et de l'énergie qui constituent l'Univers et les êtres vivants apparaissent comme formés d'atomes et de molécules qui se conforment à toutes les lois physiques déterminant les propriétés de cette matière et de cette énergie. De plus, les molécules des êtres vivants n'ont pas de propriétés particulières que n'auraient pas celles des corps inertes. Cependant, les organismes vivants se distinguent des autres collections de molécules par une architecture et une logique moléculaires qui leur confèrent des fonctions propres.

Les systèmes vivants présentent une étonnante diversité. Néanmoins, ils sont construits à partir de constituants moléculaires très semblables qui ne se distinguent que par des variations somme toute mineures. De plus, leurs processus biochimiques essentiels sont communs. Ces constatations impliquent que tous les organismes qui ont vécu ou vivent actuellement sur la Terre dérivent d'un ancêtre commun et que leur diversité résulte de phénomènes évolutifs qui ont progressivement adapté aux conditions environnementales les processus fondamentaux déjà présents chez cet ancêtre commun.

Architecture moléculaire

Tous les organismes vivants sont constitués de cellules. La cellule est l'unité du vivant ; elle en a toutes les propriétés. L'analyse d'une cellule révèle qu'elle est constituée de deux types de molécules : des macromolécules et des petites molécules.

Les macromolécules sont des polymères construits par répétition d'une même réaction ; à chaque étape, un même type de module est ajouté de façon à former un ensemble constitué de centaines, voire de milliers de résidus. Les macromolécules cellulaires sont de quatre types : (1) les protéines, édifiées à partir de vingt aminoacides différents, qui assument toutes les activités et performances des êtres vivants ; (2) l'acide désoxyribonucléique (DNA), élaboré à partir de seulement quatre types de désoxyribonucléotides, qui assure la conservation de l'information génétique d'une cellule et sa transmission, inchangée, d'une génération à une autre ; (3) les acides ribonucléiques (RNA), assemblés à partir de quatre types principaux de ribonucléotides, qui permettent le transfert vers les protéines de l'information contenue dans le DNA et enfin (4) les polysaccharides, constitués de résidus glucose, qui constituent une partie de la réserve d'énergie chimique nécessaire à la cellule.

Les petites molécules se forment généralement d'une toute autre manière au cours d'une suite de réactions où, à chaque étape, un atome ou un groupe limité d'atomes est ajouté ou retranché sous l'action d'un enzyme particulier qui se comporte en catalyseur spécifique. Les petites molécules ont des fonctions très diverses. Elles peuvent être, tels les aminoacides, les nucléotides ou les oses simples, les modules élémentaires à partir desquels se construisent les édifices macromoléculaires ; elles peuvent aussi, tels les phospholipides et le cholestérol, s'associer pour former les membranes biologiques qui assurent la compartimentation de la cellule ; elles peuvent enfin, tels les oses simples, les acides gras et les aminoacides, constituer un ensemble de molécules immédiatement disponibles à partir desquelles la cellule crée de l'énergie directement utilisable lorsqu'elle en a besoin pour ses activités.

Logique moléculaire

Le vivant se distingue de l'inanimé par deux caractères. Tout d'abord, les êtres vivants ont la capacité de reproduction invariante et de morphogenèse. De plus, ils extraient et transforment continûment l'énergie contenue dans les molécules ou dans la lumière solaire de leur environnement, puis ils l'utilisent pour maintenir leurs structures complexes et ordonnées ou effectuer un travail osmotique, chimique ou mécanique. Ainsi, ils ne sont jamais en équilibre avec leur environnement mais se présentent dans un état dynamique de création continue. La matière inanimée, elle, tend vers un état désordonné qui la met en équilibre avec ce qui l'entoure.

L'objet de la Partie I de ce livre est d'exposer la structure et les propriétés des principaux types de biomolécules qui constituent la cellule.

Chapitre 1

Aminoacides, peptides et protéines

Présentes chez tous les êtres vivants, des Bactéries à l'Homme, les protéines sont de très gros biopolymères formés à partir de seulement 20 monomères différents. Ces monomères sont des α-aminoacides qui s'unissent par des liaisons peptidiques pour former des chaînes polypeptidiques linéaires. Ces α-aminoacides constituent un alphabet universel, apparu il y a plus de deux milliards d'années, grâce auquel sont écrites des milliers de séquences, toutes différentes, propres chacune à une protéine.

Dans une chaîne polypeptidique, la séquence des α-aminoacides, c'est-à-dire l'ordre dans lequel ces derniers sont unis, détermine la structure primaire. Les protéines possèdent la propriété de morphogenèse autonome en ce sens qu'un déterminisme interne assure la formation spontanée de leur structure tridimensionnelle, quelle qu'en soit la complexité, à partir de leur structure primaire. Les protéines ont donc une structure d'ensemble imposée par la nature et la séquence de leurs α-aminoacides qui toutes deux déterminent des actions morphogénétiques internes décisives, même si des interactions avec le milieu peuvent moduler certaines conformations. Des régions du squelette peptidique adoptent une conformation régulière, en hélice α ou en feuillet plissé β, dite structure secondaire. Les hélices et les feuillets plissés reliés par des boucles de conformation non régulière, se reploient en des unités compactes et globulaires appelées domaines dont l'organisation tridimensionnelle constitue la structure tertiaire de la chaîne polypeptidique. Certaines protéines ont une seule chaîne polypeptidique, d'autres en contiennent plusieurs disposées en une structure quaternaire spécifique.

On distingue, selon leur forme, deux groupes principaux de protéines, les protéines globulaires, solubles ou transmembranaires, de beaucoup les plus nombreuses, où le reploiement des chaînes polypeptidiques conduit à une structure compacte, et les protéines fibreuses qui sont des molécules très allongées.

LES α-AMINOACIDES

Les α-aminoacides ont pour formule générale R – Cα (H, NH_3^+) – COO^- où un carbone tétraédrique chiral Cα est uni à un carboxyle –COO^-, une amine primaire –NH_3^+, un hydrogène –H et une chaîne latérale –R propre à chaque α-aminoacide (*Figure 1.1A*). Les α-aminoacides ont trois caractères structuraux fondamentaux qui déterminent leurs propriétés :

1. La configuration du Cα

Lorsque les modèles des α-aminoacides sont disposés selon la convention de Fischer, la chaîne carbonée est verticale et vue par sa convexité ; le –COO^-, dont le niveau d'oxydation est le plus élevé, est placé vers le haut et le –NH_3^+ peut alors se situer soit à gauche, soit à droite du Cα chiral ; les α-aminoacides appartiennent alors à la série L (du latin *laevus*, côté gauche) ou à la série D (du latin *dexter*, côté droit), respectivement (voir les modèles de l'alanine, Figures 1.1A et B). Il existe donc, pour chaque α-aminoacide, sauf pour la glycine où R = H, deux stéréoisomères (énantiomères), images l'un de l'autre dans un miroir ; les α-aminoacides des protéines de tous les êtres vivants connus appartiennent à la série L.

2. La fonction α-aminoacide

En milieu aqueux, les α-aminoacides sont ionisés et l'état d'ionisation est fonction du pH (voir la courbe de titration de l'alanine, Figure 1.1C). En milieu très acide, le carboxyle et l'amine sont protonés et l'α-aminoacide porte une charge positive ; à pH 2,3 (pK_a du carboxyle), un premier point d'inflexion apparaît ; à pH 6 (pH isoélectrique ou point isoélectrique pI), la charge positive est égale à la charge négative et l'α-aminoacide se présente comme un ion dipolaire (zwitterion) ; à pH 9,9 (pK_a de l'amine), un deuxième point d'inflexion apparaît ; en milieu très alcalin, le carboxyle et l'amine sont déprotonés et l'α-aminoacide porte une charge négative.

Deux α-aminoacides peuvent s'unir par condensation du carboxyle de l'un avec l'amine de l'autre, ce qui conduit à un dipeptide présentant une liaison peptidique –CO–NH– dont le –CO est situé du côté de l'extrémité N-terminale et le –NH du côté de l'extrémité C-terminale (*Figure 1.1D*). La liaison peptidique est plane, rigide et polaire (*Figure 1.1E*) ; C, O, N, H et les deux Cα voisins sont dans un plan où ils constituent une unité peptidique ; l'angle de torsion Ω autour de la liaison C-N ne peut prendre que la valeur 0°, configuration *cis* où O et H sont d'un même côté de l'axe C-N, ou +180°, configuration *trans* où O et H sont de part et d'autre de l'axe C-N ; pour toutes les liaisons peptidiques des protéines, la configuration *trans* est énergétiquement la plus favorable, sauf dans celles où intervient la proline. Ces caractères résultent du fait que la liaison peptidique est un hybride de résonance où les électrons sont localisés dans une orbitale moléculaire π qui recouvre les atomes O, C et N (*Figure 1.1F*) et empêche la libre rotation autour de l'axe C-N. Par ailleurs, l'oxygène étant plus électronégatif que l'azote, les électrons sont déplacés vers O. La liaison peptidique possède donc une géométrie fixe et les longueurs et les angles de liaison peuvent être mesurés (*Figure 1.1G*).


Figure 1.1
(A)
Groupe carboxyle
Miroir
Carbone α
Groupe amine
Carbone β
Groupe méthyle (chaîne latérale-R)
L-Alanine
D-Alanine
Modèle moléculaire
(B)
Miroir
COO⊖
H3N⊕
C α
H
R
NH3⊕
L-α-Aminoacide
D-α-Aminoacide
Projection de Fischer
(C)
pH
Les 2 groupes sont déprotonés
pK2 = 9,9
(NH3CHRCOO−) / (NH2CHRCOO−) = 1
pH = 6,0
(NH3CHRCOO−)
Zwitterion
pK1 = 2,3
(NH3CHRCOOH) / (NH3CHRCOO−) = 1
Les 2 groupes sont protonés
COOH
0,5
1
1,5
Équivalents OH−
(D)
H3N — CH — COO⊖
H2O
Extrémité N-terminale
Extrémité C-terminale
Liaison peptidique
(E)
+0,20
+0,42
−0,20
−0,42
Ω
(F)
Cα
C
N
H
O
δ = + 0,42
δ = − 0,20
(G)
1,33 Å
1,0 Å
119,5
118,2
115,6
121,9
121,1
123,2
1,52 Å
1,23 Å
1,45 Å
C α

3. La structure et les propriétés de la chaîne latérale

Les 20 α-aminoacides à partir desquels sont construites toutes les protéines connues sont caractérisés par leur chaîne latérale ; chaque α-aminoacide porte un nom, d'abord abrégé selon un code à trois lettres puis à une lettre, qui permet d'écrire et de comparer les séquences des protéines. Selon la nature de la chaîne latérale, on distingue trois groupes d'α-aminoacides : apolaires, polaires neutres et polaires ionisables. Le caractère apolaire ou polaire des aminoacides est fondamental car il conditionne leur hydrophilie ou leur hydrophobicité et détermine le reploiement et la conformation des chaînes polypeptidiques au sein des cellules. De plus, la structure des chaînes latérales détermine la réactivité de chaque α-aminoacide. L'ensemble de ces réactivités confère aux protéines la possibilité d'effectuer les interactions discriminatives qui constituent leur fonction.

Les chaînes latérales des α-aminoacides apolaires (*Tableau 1.1*) sont de nature aliphatique (G, A, V, L, I, M et P) ou aromatique (F et W) et donc très hydrophobes. G, avec sa chaîne latérale réduite à un hydrogène, joue un rôle particulier dans la conformation des chaînes polypeptidiques (p. 14). Les chaînes latérales de A, V, L et I, de plus en plus volumineuses, ont un caractère hydrophobe croissant ; I, avec son Cβ chiral, a quatre stéréoisomères dont un seul est rencontré dans les protéines. M, avec son méthyl thioéther apolaire, a été sélectionnée de préférence à la norleucine [$–(CH_2)_3–CH_3$] en raison de son soufre nucléophile. P, avec son hétérocycle pyrrolidine, est un α-aminoacide qui joue un rôle particulier dans la conformation des protéines (p. 14). F et W peuvent s'associer par recouvrement de leur nuage électronique π à nombre d'autres constituants biochimiques.

Les chaînes latérales des α-aminoacides polaires non ionisables (*Tableau 1.2*) ont des groupes fonctionnels hydroxyle, sulfhydryle ou amide. Les hydroxyles de S et de T, polaires mais très peu ionisables, confèrent un certain caractère hydrophile à la chaîne latérale aliphatique et l'hydroxyméthyle de S peut être très réactif au sein des protéines ; T a deux centres de chiralité, mais un seul stéréoisomère est rencontré dans les protéines. L'hydroxyle de Y est plus ionisable ($pK_a = 10{,}5$) que celui de S ou de T, ce qui rend Y moins hydrophobe que F. Bien que la chaîne latérale de C soit assez hydrophobe, son sulfhydryle légèrement ionisable ($pK_a = 8{,}4$) lui confère une grande réactivité ; C peut former des liaisons H avec des atomes O ou N, perdre son proton et devenir un ion thiolate chargé négativement, et enfin contracter avec une autre C, au sein d'une chaîne polypeptidique ou entre deux chaînes polypeptidiques, une liaison covalente, dite liaison disulfure, susceptible de contribuer fortement à la stabilité de la conformation d'une protéine. L'amide de N et de G, qui ne s'ionise pas, est peu réactif mais il est polaire et peut jouer le rôle d'accepteur ou de donneur dans des liaisons H.

Les chaînes latérales des α-aminoacides polaires ionisables (*Tableau 1.3*) possèdent des groupes fonctionnels très hydrophiles dont la charge est fonction du pH. Au pH physiologique, les chaînes latérales de D et de E se terminent par un β– ou un γ-carboxyle ionisé qui contribue à la charge négative des protéines lorsqu'il se situe à leur périphérie. Les chaînes latérales de K, R et H se terminent par des groupes azotés basiques, ε-amine primaire, groupe guanidinium ou hétérocycle imidazole, respectivement ; au pH physiologique, celles de K et de R sont protonées et apportent des charges positives aux protéines ; celle de H est un catalyseur extrêmement efficace car dans sa forme non ionisée, l'azote portant l'hydrogène est un électrophile et un donneur de proton tandis que l'autre azote est un nucléophile et un accepteur de proton.

Tableau 1.1

AMINOACIDE		CHAÎNE LATÉRALE	
Nom	**Abréviations**	**Groupe fonctionnel**	**Modèle moléculaire**
Glycine	Gly, G	$-H$	
Alanine	Ala, A	$-CH_3$	
Valine	Val, V	$-CH(CH_3)$ CH_3 (H_3C, CH_3)	
Leucine	Leu, L	$-CH_2-CH$ (H_3C, CH_3)	
Isoleucine*	Ile, I	H_3C ► C ◄ H, CH_2, CH_3	
Méthionine	Met, M	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$	
Proline	Pro, P	$COO^{\ominus}$; $H_2N^{\oplus}$ — C — H; H_2C, CH_2, CH_2 — hétérocycle pyrrolidine	
Phénylalanine	Phe, F	$-CH_2$–(cycle benzénique) — cycle benzénique	
Tryptophane	Trp, W	$-CH_2$–(indole, N–H) — hétérocycle indole	

* Seul isomère rencontré dans les protéines.

Tableau 1.2

AMINOACIDE		CHAÎNE LATÉRALE	
Nom	**Abréviations**	**Groupe fonctionnel**	**Modèle moléculaire**
Sérine	Ser, S	$-CH_2-OH$	
Thréonine*	Thr, T	$H-C(-CH_3)-OH$	
Tyrosine	Tyr, Y	$-CH_2-C_6H_4-OH$	
Cystéine	Cys, C	$-CH_2-SH$	
Asparagine	Asn, N	$-CH_2-C(=O)-NH_2$	
Glutamine	Gln, Q	$-CH_2-CH_2-C(=O)-NH_2$	

* Seul isomère rencontré dans les protéines.

Cystéine H + H Cystéine

Réduction

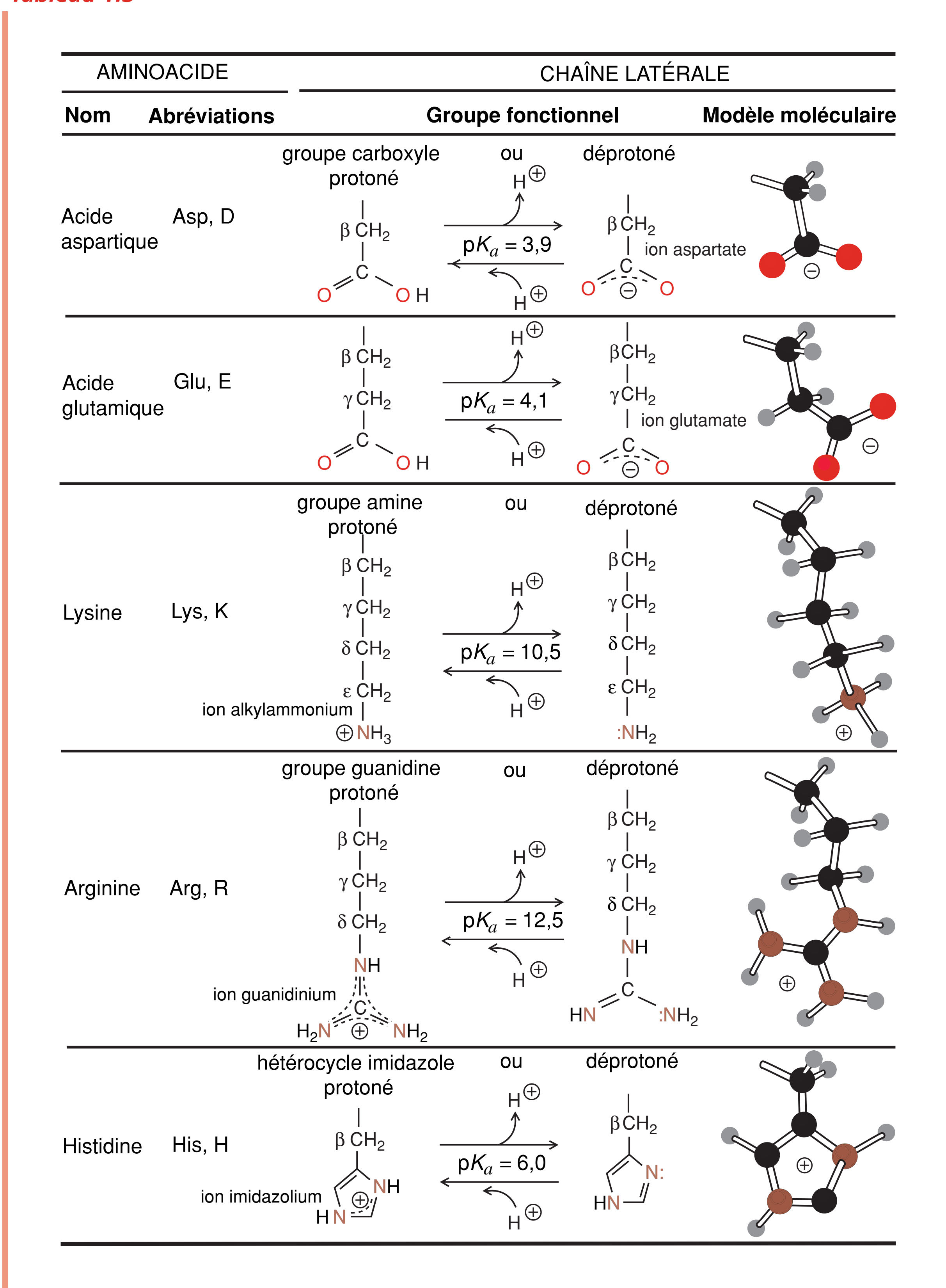
Oxydation

Liaison disulfure

Cystine

carbone soufre hydrogène

Tableau 1.3


AMINOACIDE
CHAÎNE LATÉRALE
Nom
Abréviations
Groupe fonctionnel
Modèle moléculaire
Acide aspartique
Asp, D
groupe carboxyle protoné
ou
déprotoné
$pK_a = 3{,}9$
ion aspartate
Acide glutamique
Glu, E
$pK_a = 4{,}1$
ion glutamate
Lysine
Lys, K
groupe amine protoné
ou
déprotoné
$pK_a = 10{,}5$
ion alkylammonium
$\oplus NH_3$
$:NH_2$
Arginine
Arg, R
groupe guanidine protoné
ou
déprotoné
$pK_a = 12{,}5$
ion guanidinium
H_2N
NH_2
NH
HN
$:NH_2$
Histidine
His, H
hétérocycle imidazole protoné
ou
déprotoné
$pK_a = 6{,}0$
ion imidazolium
NH
HN
N:

LA CHAÎNE POLYPEPTIDIQUE ET SES CONFORMATIONS

Une chaîne polypeptidique (*Figure 1.2A*) est formée par des aminoacides unis par des liaisons peptidiques. Elle se présente donc comme une succession de plans contenant des unités peptidiques –Cα–CO–NH–Cα– qui crée une chaîne principale d'où se projettent les chaînes latérales, ou résidus aminoacide. Elle est définie par la séquence des aminoacides qui détermine la structure primaire. Les propriétés propres à la liaison peptidique, associées aux propriétés particulières des résidus aminoacide unis selon une séquence donnée, déterminent les interactions morphogénétiques internes qui imposent spontanément une structure et une conformation propres à chaque chaîne polypeptidique.

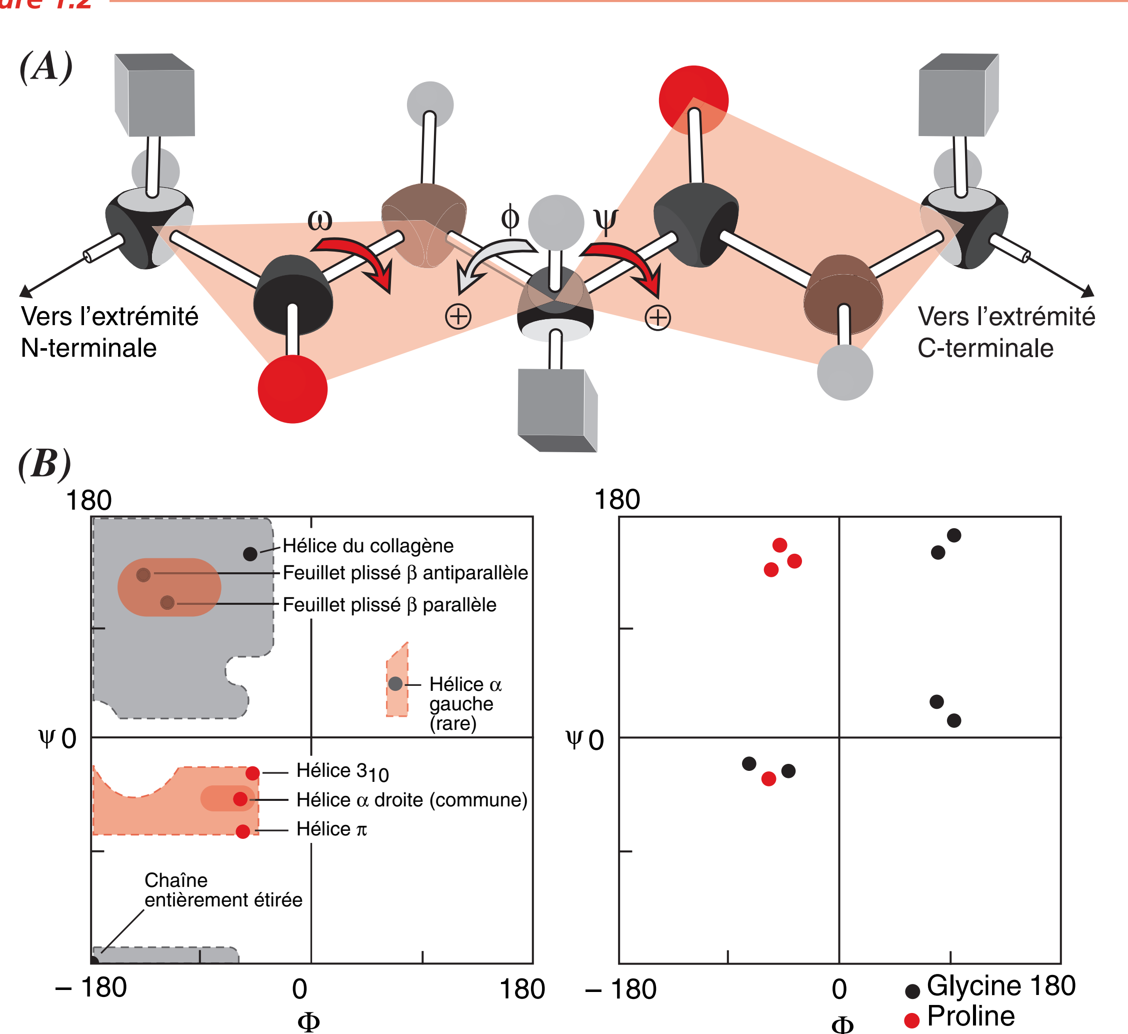
Une chaîne polypeptidique a deux types de liberté de rotation (*Figure 1.2A*) qui lui permettent d'adopter les conformations qui caractérisent sa structure secondaire :

- la liberté de rotation d'un angle Φ autour de la liaison unissant le carbone α à l'azote amidique (liaison Cα–N) ;

– la liberté de rotation d'un angle Ψ autour de la liaison unissant ce même carbone α au carbone du carbonyle (liaison Cα–C).

Selon une convention internationale, les rotations mesurées par Φ et Ψ ont le sens indiqué dans la Figure 1.2A et leur champ est de 180°. Ces deux angles ont la valeur de +180° (ou, ce qui revient au même, de – 180°), lorsque la chaîne est totalement étirée. En examinant les conformations définies par Φ et Ψ, il est possible de reconnaître celles qui ne sont pas possibles en raison d'un encombrement stérique et d'établir les tableaux de Ramachandran (*Figure 1.2B*). Pour la plupart des résidus, les couples de valeurs stériquement permis sont groupés essentiellement dans deux régions. Les valeurs de Φ comprises entre – 50° et – 60° ou entre – 120° et – 140° apparaissent comme privilégiées. Certaines valeurs de Ψ déterminent des conformations régulières de la chaîne principale lorsque plusieurs résidus consécutifs ont les mêmes couples de valeurs de Φ et de Ψ. Ce sont des conformations hélicoïdales droites, dites α, (Ψ = – 47°) ou formées à partir de brins β, dites en feuillets plissés β antiparallèles ou parallèles (Ψ = +135° et +113°, respectivement). Elles sont favorisées et stabilisées par les liaisons hydrogène qui s'établissent entre les CO et les NH polaires de la chaîne principale qui devient alors beaucoup moins hydrophile. La glycine est une importante exception ; avec son hydrogène comme chaîne latérale, cet α-aminoacide peut prendre un beaucoup plus grand nombre de conformations que les autres résidus et permettre à la chaîne principale d'adopter certaines conformations. La proline, en raison de la présence de son cycle pyrrolidine, voit son angle Φ bloqué à – 65° environ. Les hélices et les feuillets plissés sont universellement présents dans les chaînes polypeptidiques des protéines dont ils constituent la structure secondaire.





Conformation	Angles (degrés) Φ	Ψ	ω	Résidus/tour	Translation/résidu (Å)
Hélice α droite	– 57	– 47	180	3,6	1,50
Hélice α gauche	+ 57	+ 47		3,6	1,50
Hélice 3_{10} droite	– 49	– 26	180	3,0	2,00
Hélice π droite	– 57	– 70	180	4,4	1,15
Hélice gauche du collagène	– 51	+ 153		3,0	3,13
Feuillet plissé β					
antiparallèle	– 139	+ 135	– 178	2,0	3,40
parallèle	– 119	+ 113	180	2,0	3,20
Chaîne étirée	180	180			

● carbone ● oxygène ● azote ● hydrogène

1. Hélice α

Dans une hélice α (*Figures 1.3A et 3B*), les chaînes latérales des résidus aminoacides se projettent vers l'extérieur et n'interfèrent pas avec l'hélice elle-même, sauf celle du résidu prolyl dont le dernier carbone est lié à l'azote amidique. Les oxygènes des CO pointent vers l'extrémité C-terminale, les hydrogènes des NH vers l'extrémité N-terminale et des liaisons hydrogène s'établissent entre les CO et les NH ; individuellement, ces liaisons n'ont pas une grande énergie de stabilisation mais leur accumulation stabilise fortement l'hélice α, en particulier au sein des régions hydrophobes des protéines. L'orientation des groupes peptidiques étant la même tout au long de l'hélice, leurs moments dipolaires se cumulent et une hélice α de n résidus a un moment dipolaire résultant de $n \times 3{,}5$ unités Debye, avec son extrémité N-terminale chargée positivement et son extrémité C-terminale chargée négativement. Ces charges peuvent attirer des ligands possédant des charges opposées. Ainsi, des ligands chargés négativement, en particulier ceux qui contiennent des groupes phosphoryl, se lient fréquemment à l'extrémité N-terminale des hélices α qui, de plus, peut les positionner favorablement par des liaisons hydrogène spécifiques grâce à ses groupes NH libres. Les hélices qui ne font pas partie d'un site de liaison ont souvent un résidu aminoacide chargé négativement à leur extrémité N-terminale ou positivement à leur extrémité C-terminale. Ce résidu est dit compensateur de dipôle car il interagit avec le dipôle de l'hélice et stabilise la conformation hélicoïdale. L'extrémité C-terminale des hélices α, où les derniers CO sont libres, est polaire et presque toujours localisée à la surface des protéines. Beaucoup d'hélices α sont amphotères, en ce sens qu'elles présentent essentiellement des résidus apolaires sur un côté et des résidus polaires sur l'autre. Dans les protéines globulaires, la longueur des hélices α peut varier considérablement, de quatre ou cinq résidus aminoacide à plus d'une quarantaine, avec une moyenne de 10, soit trois tours sur une longueur de 15 Å environ. Dans la représentation schématique d'une protéine, on donne aux hélices α la forme d'un ruban enroulé en spirale.

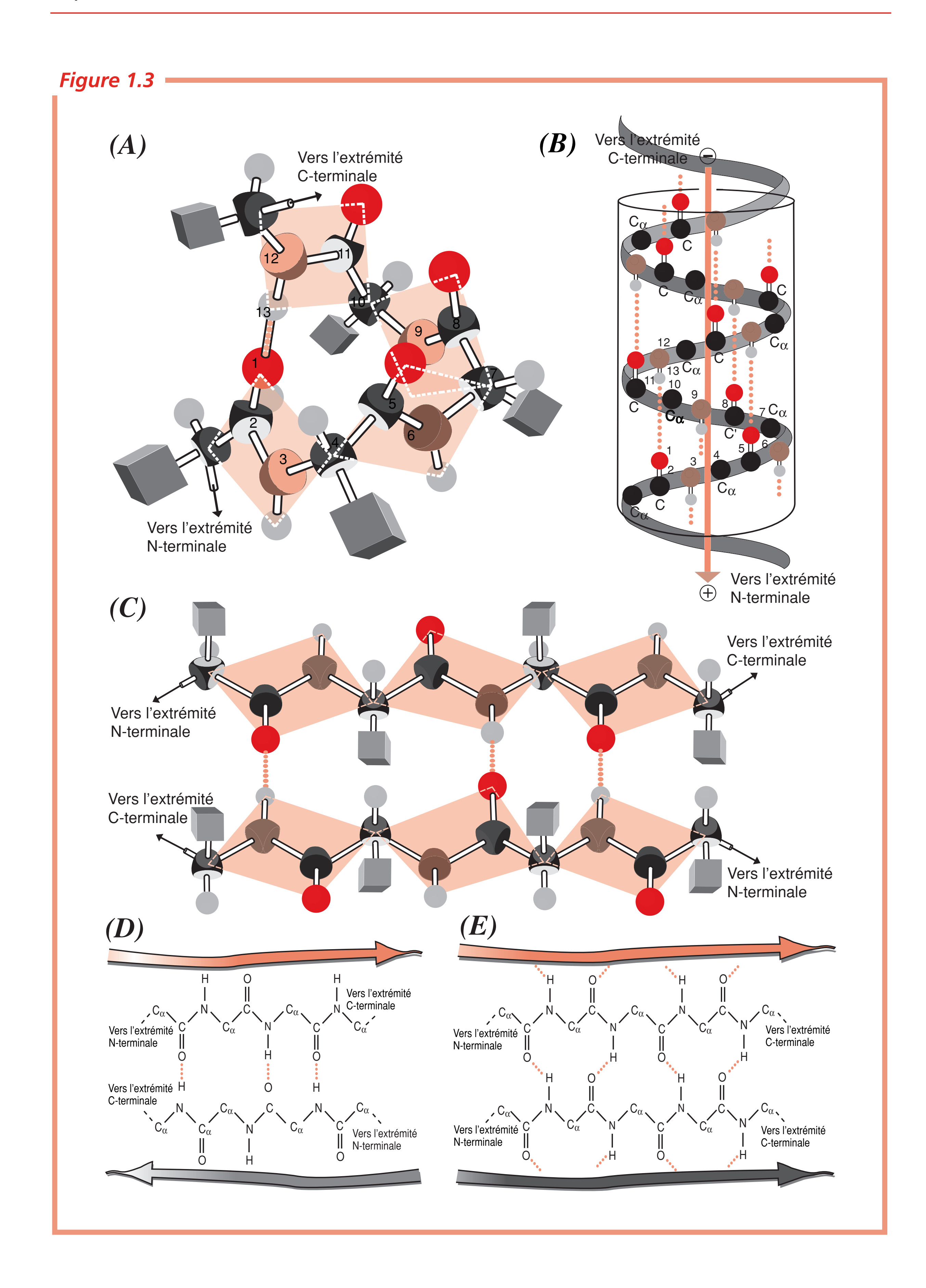
2. Brins β et feuillets plissés β

Le brin β est une conformation constituée d'un fragment de chaîne polypeptidique presque totalement étirée. Isolée, cette conformation n'est pas stable car il n'y a pas d'interactions entre atomes non directement liés ; en revanche, elle est stabilisée lorsqu'elle est incorporée dans des feuillets plissés β où des liaisons hydrogène s'établissent entre les CO et les NH appartenant à des brins adjacents (*Figure 1.3C*). Les brins peuvent y être soit antiparallèles (*Figure 1.3D*), soit parallèles (*Figure 1.3E*). Dans la représentation schématique d'une protéine, on donne aux brins β la forme d'une flèche.

3. Boucles et coudes

Les hélices et des feuillets plissés sont connectés par des régions de conformation non répétitive et souvent irrégulière, de longueur variable, les coudes ou les boucles.

Figure 1.3


(A)
Vers l'extrémité C-terminale
Vers l'extrémité N-terminale
(B)
Vers l'extrémité C-terminale
Vers l'extrémité N-terminale
(C)
Vers l'extrémité N-terminale
Vers l'extrémité C-terminale
Vers l'extrémité C-terminale
Vers l'extrémité N-terminale
(D)
Vers l'extrémité C-terminale
Vers l'extrémité N-terminale
Vers l'extrémité C-terminale
Vers l'extrémité N-terminale
(E)
Vers l'extrémité N-terminale
Vers l'extrémité C-terminale
Vers l'extrémité N-terminale
Vers l'extrémité C-terminale

REPLOIEMENT DES CHAÎNES POLYPEPTIDIQUES DES PROTÉINES GLOBULAIRES HYDROSOLUBLES

L'étude de la structure à haute résolution de nombre de protéines a fait apparaître les principes fondamentaux qui gouvernent la structure des protéines globulaires (*Figure 1.4A*). Ces dernières contiennent des hélices et des feuillets plissés qui sont des éléments de structure secondaire régulière où les résidus consécutifs adoptent la même conformation. Les hélices et les feuillets sont connectés par des boucles de conformation non répétitive et de longueur variable, qui permettent les changements de direction de la chaîne polypeptidique nécessaires à la protéine pour qu'elle prenne sa forme globulaire. Si la combinaison d'hélices et/ou de feuillets plissés constitue le core hydrophobe interne stable de la protéine, les boucles, essentiellement constituées de résidus hydrophiles, se situent à la surface de cette dernière et peuvent donc entrer en interaction avec l'environnement aqueux. De plus, les groupes CO et NH de la chaîne principale des boucles n'établissent pas de liaisons hydrogène entre eux mais en contractent avec les molécules d'eau du milieu ambiant.

Les caractères les plus remarquables des molécules de protéines sont leur complexité et leur manque de symétrie. Une telle irrégularité de structure est en fait nécessaire aux protéines globulaires pour qu'elles puissent remplir leurs fonctions. Elles doivent en effet reconnaître des milliers de molécules très diverses au sein des cellules au moyen d'interactions tridimensionnelles très précises, ce qui nécessite des structures irrégulières et variées presque à l'infini.

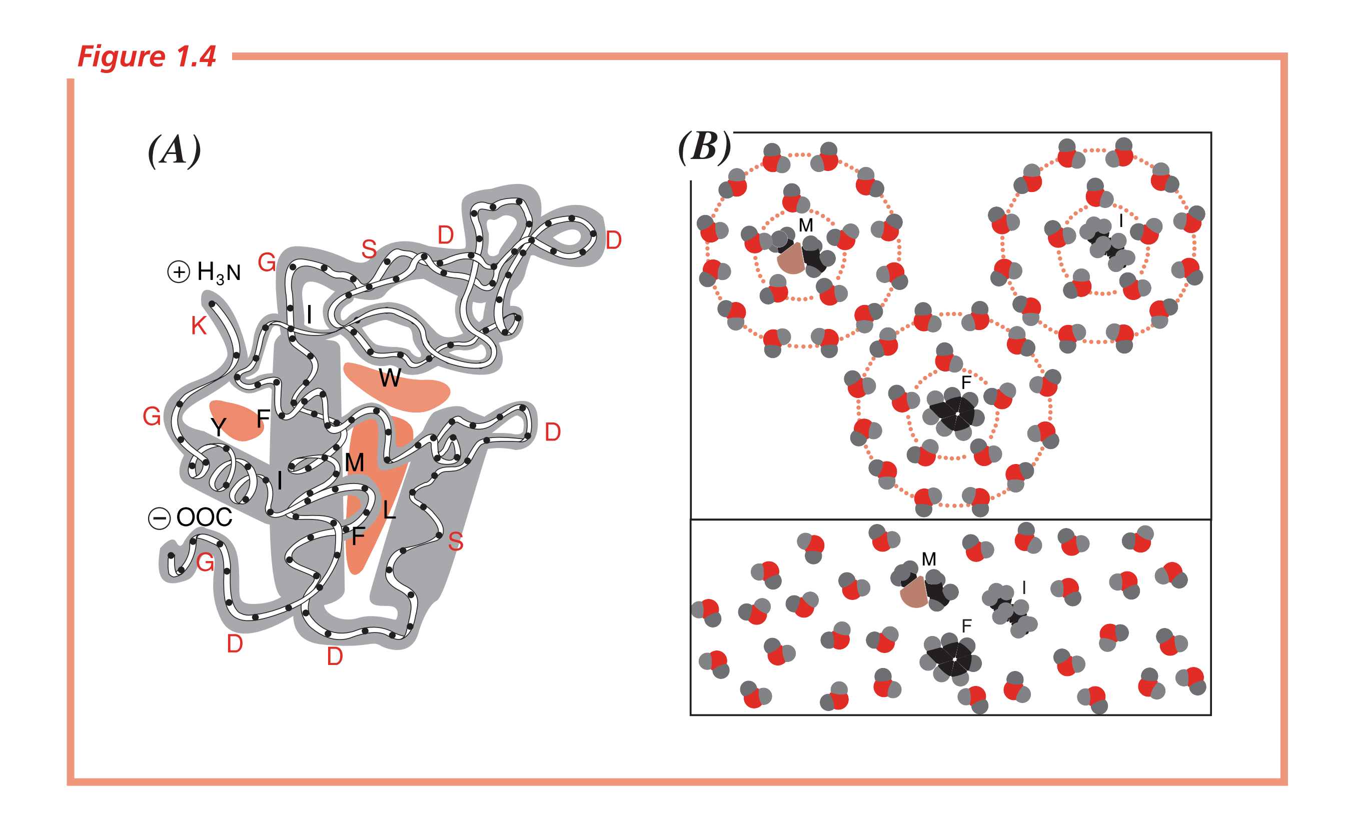
Les résidus aminoacide localisés à l'intérieur de la protéine sont presque exclusivement hydrophobes, tandis que ceux qui sont à sa périphérie sont hydrophiles. Il existe donc une force qui impose aux chaînes polypeptidiques des protéines globulaires hydrosolubles de se reployer spontanément de façon à créer un core hydrophobe et une surface hydrophile. Quelle est la nature de cette force ?

Le reploiement des protéines globulaires hydrosolubles dépend de plusieurs types d'interactions

Le reploiement des protéines globulaires et la stabilisation de leur conformation biologiquement fonctionnelle dépendent de plusieurs types d'interactions non covalentes : interactions hydrophobes, liaisons hydrogène, interactions de van der Waals et liaisons ioniques. Bien que prises individuellement ces interactions soient faibles, la somme de toutes celles qui entrent en jeu dans une protéine stabilise efficacement la conformation native de cette dernière. Le processus de reploiement des protéines s'effectue grâce à la stabilisation progressive d'intermédiaires. Une chaîne polypeptidique se condense d'abord en un globule fondu qui possède l'essentiel de la structure secondaire, mais pas la structure tertiaire ; ce dernier évolue ensuite vers la conformation native de la protéine.

La formation des globules fondus résulte d'interactions hydrophobes (*Figure 1.4B*) qui constituent la composante la plus importante de la force qui dirige le reploiement des protéines. Les protéines sont plus stables en milieu aqueux lorsque leurs résidus aminoacide hydrophobes sont dissimulés à l'intérieur de la protéine que lorsqu'ils sont solvatés par l'eau. Cette tendance des groupes hydrophobes à s'associer les uns avec les autres au sein de la molécule protéique leur permet d'éviter le contact avec les molécules d'eau de leur

Figure 1.4



environnement. L'agrégation de la plupart des résidus aminoacide hydrophobes à l'intérieur de la protéine impose alors un reploiement de la chaîne polypeptidique caractérisé par la formation d'un core hydrophobe d'où l'eau est exclue et le déploiement des résidus polaires hydrophiles à la surface de la protéine où ils sont au contact direct de l'eau avec laquelle ils entrent en interaction (*Figure 1.4A*). La chaîne principale est constituée par les enchaînements –Cα–CO–NH–Cα– où les groupes CO et NH sont polaires et hydrophiles. Ces derniers perdent leur caractère polaire et leur hydrophilie lorsqu'ils sont unis par les liaisons hydrogène au sein des structures secondaires en hélice ou en feuillet plissé qui jouent donc, à ce niveau, un rôle essentiel dans la formation du core hydrophobe.

La stabilisation de la structure native est assurée par des liaisons hydrogène qui se forment entre les régions périphériques de la chaîne principale et l'eau, entre la chaîne principale et des résidus polaires, entre deux résidus polaires ou entre un résidu polaire et l'eau. La plupart des liaisons hydrogène des protéines sont du type –N–H–O–, avec une longueur variant de 2,6 à 3,4 Å.

Certains contacts de van der Waals entre groupes non polaires optimisent aussi le reploiement de la chaîne polypeptidique et contribuent à la stabilité des protéines globulaires hydrosolubles.

Les interactions ioniques entre résidus aminoacide de charges opposées, ainsi que la solvatation des résidus chargés à la surface de la protéine, aident à la stabilisation.

Enfin, bien qu'absentes dans les protéines intracellulaires, les liaisons disulfure intrachaînes, de nature covalente, stabilisent très efficacement la conformation native des protéines globulaires sécrétées et les rendent moins sensibles à la dénaturation et à la dégradation.

Le reploiement des protéines *in vivo* est assisté par des isomérases et des chaperons moléculaires

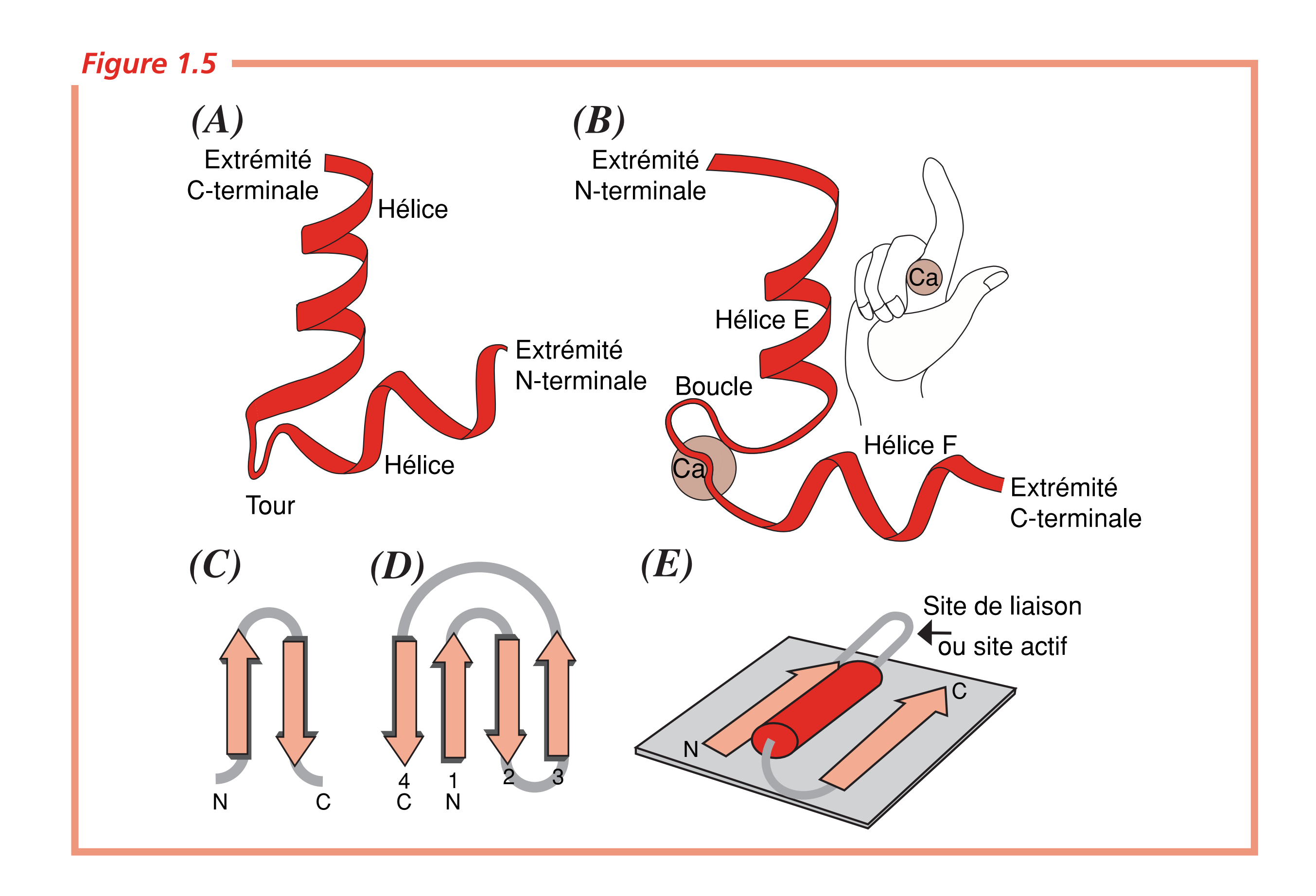
Toutes les liaisons peptidiques adoptent la configuration *trans*, à l'exception de certaines liaisons X-Pro, où X représente un résidu quelconque, qui peuvent prendre la configuration *cis* (p. 14). La *cis*-proline a un rôle structural important car elle favorise la formation de coudes. L'isomérisation spontanée de la liaison X-Pro est lente en raison du caractère de double liaison partielle de cette dernière et elle serait une étape limitante du reploiement des chaînes polypeptidiques si, *in vivo*, elle n'était accélérée par des peptidyl prolyl isomérases qui déforment la liaison peptidique de telle façon que les atomes C, O, et N ne soient plus coplanaires et que la barrière d'activation soit abaissée. De plus, la formation de liaisons disulfure correctes dans les protéines naissantes est accélérée, *in vivo*, par la disulfure isomérase, enzyme de large spécificité pour des substrats contenant des résidus cystéine. Ce dernier, en brassant les liaisons disulfure permet aux protéines naissantes de trouver rapidement les appariements thermodynamiquement les plus favorables. Enfin, au sein de la cellule, milieu très encombré, deux classes de chaperons moléculaires, les Hsp 70 et les chaperonines, orientent au niveau moléculaire le reploiement des chaînes polypeptidiques en empêchant des conformations incorrectes ou des liaisons inappropriées avec d'autres constituants du milieu. Isomérases et chaperons ne font qu'assister le reploiement des chaînes polypeptidiques ; elles ne le dirigent pas et leur présence ne contredit en rien le dogme de la morphogenèse autonome qui seule détermine la conformation des protéines, comme celle des autres structures complexes des êtres vivants.

DES MOTIFS DE REPLOIEMENT, OU STRUCTURES SUPERSECONDAIRES, SONT FORMÉS À PARTIR D'HÉLICES α ET/OU DE BRINS β

Au sein des protéines globulaires reployées, des éléments de structure secondaire, hélices α et/ou brins β, peuvent s'associer en des motifs appelés parfois structures supersecondaires et retrouvés fréquemment dans nombre de protéines. Ces motifs peuvent avoir une fonction particulière ou simplement être partie constituante d'unités structurales et fonctionnelles plus grandes et plus élaborées, les domaines.

Le motif doué de fonction le plus simple est constitué de deux hélices α unies par un coude ou une boucle. Le motif hélice-coude-hélice (*Figure 1.5A*) s'associe spécifiquement aux régions régulatrices du DNA des Procaryotes. Le motif hélice-boucle-hélice, appelé aussi E-F hand (*Figure 1.5B*), dont la boucle est un site de liaison pour les ions Ca^{2+}, est régulièrement présent dans les protéines qui fixent le calcium et régulent de nombreux processus biologiques, telles les parvalbumines, la calmoduline, la troponine C ou certaines chaînes légères de la myosine.

Figure 1.5



Le motif en épingle à cheveux β (*Figure 1.5C*) est constitué de deux brins β adjacents antiparallèles connectés par un coude β en épingle à cheveux. Présent dans la plupart des structures β, soit isolément, soit comme constituant de feuillets plus complexes, il n'a pas en lui-même de fonction spécifique. La grecque est un motif constitué de quatre brins β où l'une des connexions n'est pas une épingle à cheveux (*Figure 1.5D*). Ce motif, souvent rencontré dans les protéines globulaires, n'a pas non plus en lui-même de fonction spécifique.

Le motif β-α-β (*Figure 1.5D*) est constitué de deux brins β parallèles dont l'extrémité C-terminale de l'un est connectée par une hélice α à l'extrémité N-terminale de l'autre. L'hélice α, approximativement parallèle aux brins β, est étroitement associée à ces derniers dont elle dissimule les résidus aminoacide hydrophobes au milieu aqueux. Entre les brins β et l'hélice α, il y a deux boucles dont les longueurs peuvent varier de deux à trois résidus aminoacide à plus d'une centaine. Un motif β-α-β peut être considéré comme un enroulement hélicoïdal lâche d'un tour ; il est droit dans toutes les protéines connues, à l'exception de la subtilisine où il joue un rôle particulier. Que cet enroulement soit droit a d'importantes conséquences structurales et fonctionnelles lorsque les motifs β-α-β sont inclus dans des domaines. Les deux boucles ont des fonctions différentes. Celle qui relie l'extrémité C-terminale du premier brin β à l'extrémité N-terminale de l'hélice α est souvent impliquée dans la formation d'un site de liaison ou d'un site actif et possède des séquences d'aminoacides conservés dans les protéines homologues. L'autre boucle, en revanche, n'a pas de fonction connue.

LES CHAÎNES POLYPEPTIDIQUES SONT ORGANISÉES EN DOMAINES

De nombreuses protéines sont constituées de domaines qui représentent des unités structurales et fonctionnelles fondamentales (*Figure 1.6A*). Les domaines sont des chaînes polypeptidiques ou des parties de longues chaînes polypeptidiques dont la taille peut varier considérablement, de 20 à 30 résidus aminoacide à plus de 300, avec une moyenne d'environ 100. Habituellement, chaque domaine a une fonction bien définie.

Les domaines sont constitués de combinaisons d'éléments de structure secondaire et de motifs connectés par des boucles. Le plus souvent, les hélices α et les brins β des motifs formés à partir de régions voisines dans la structure primaire d'une chaîne polypeptidique sont proches dans la structure tridimensionnelle de cette dernière. Le nombre de combinaisons rencontrées dans les protéines est limité. De plus, certaines combinaisons semblent être favorisées. Ainsi, des domaines de structure semblable sont souvent retrouvés dans des protéines différentes, avec des fonctions différentes et des séquences d'aminoacides différentes.

LES STRUCTURES DES PROTÉINES PEUVENT ÊTRE RÉPARTIES EN TROIS CLASSES

Trois groupes principaux peuvent être considérés : les structures α, les structures β et les structures αβ. Dans les structures α, les domaines sont constitués uniquement d'hélices α, tandis que dans les structures β, ils sont formés de feuillets β antiparallèles. Les structures αβ résultent de combinaisons de motifs β-α-β qui forment un feuillet β parallèle entouré d'hélices α. Par ailleurs, sont classées dans un groupe à part un certain nombre de protéines, le plus souvent de faible poids moléculaire, riches en liaisons disulfure ou en métaux et dont la structure présente une certaine distorsion.

Parmi les structures α, le faisceau de quatre hélices (*Figure 1.6B*), au sein duquel des résidus hydrophobes délimitent un site actif central, est rencontré dans des protéines aussi différentes que la myohémérythrine, les cytochromes c et b_{562} et la ferritine. De même, le reploiement globinique, où là aussi des résidus hydrophobes délimitent un site actif central (*Figure 1.6C*), est présent dans toutes les protéines d'un important groupe incluant les myoglobines et les hémoglobines, mais aussi les phycocyanines. Les caractéristiques structurales et les propriétés fonctionnelles du domaine globinique ont été très conservées tout au long de l'évolution, des Insectes et des nodules des racines des Végétaux, jusqu'aux Mammifères.

Les structures β sont constituées de brins β dont le nombre peut varier de quatre à plus de dix, souvent répartis en deux feuillets antiparallèles plaqués l'un contre l'autre pour former un tonneau β affecté d'une certaine torsion (*Figure 1.6D*). Dans nombre d'entre elles, certains motifs sont des grecques. Les structures β ont un core hydrophobe constitué par les résidus aminoacide hydrophobes des brins β qui tapissent la partie interne du tonneau. Leur surface est constituée par les résidus aminoacide hydrophiles des brins β ainsi que par ceux des boucles qui unissent ces derniers. Les structures β sont présentes dans des protéines fonctionnellement très différentes, telles que des enzymes, des protéines de transport et des anticorps (*Figure 1.6E*).


Figure 1.6
(A)
EGF
CHYMOTRYPSINE
K
UROKINASE
Ca
FACTEUR IX
K K K K K
PLASMINOGÈNE
Domaines homologues au facteur de croissance épidermique, EGF.
Domaine kringle.
Domaines des sérine protéases homologues à la chymotrypsine.
Domaine de liaison au calcium.
(B)
Résidus hydrophobes
N
C
(C)
C
F
C
D
H
F
Résidus hydrophobes
E
B
G
N
A
(D)
C
N
(E)
5
1
8
4
3
2
7
N
6
C

Les structures αβ, très fréquemment rencontrées, sont constituées d'un feuillet β central, parallèle ou mixte, entouré d'hélices α. Elles se répartissent en deux classes. Les structures αβ de la première classe présentent un core de huit brins β parallèles disposés comme les douves d'un tonneau mais affectés d'une certaine torsion (*Figure 1.7A*). Les résidus aminoacide hydrophobes des brins β se disposent à l'intérieur du tonneau. Les hélices α qui connectent les brins β parallèles se disposent à la périphérie du tonneau. Les structures αβ de la deuxième classe possèdent un feuillet β ouvert entouré de chaque côté par les hélices α (*Figure 1.7B*).

Dans les structures αβ, les boucles forment des cavités qui permettent la fixation de ligands et peuvent éventuellement posséder une activité catalytique. En raison de ces propriétés, nombre de protéines de transport et d'enzymes possèdent une structure αβ ; le domaine de fixation des coenzymes nucléotidiques, des enzymes de la glycolyse, tels que la triose phosphate isomérase et la pyruvate kinase (p. 168 et 172), de même que beaucoup d'autres enzymes, en sont des exemples.

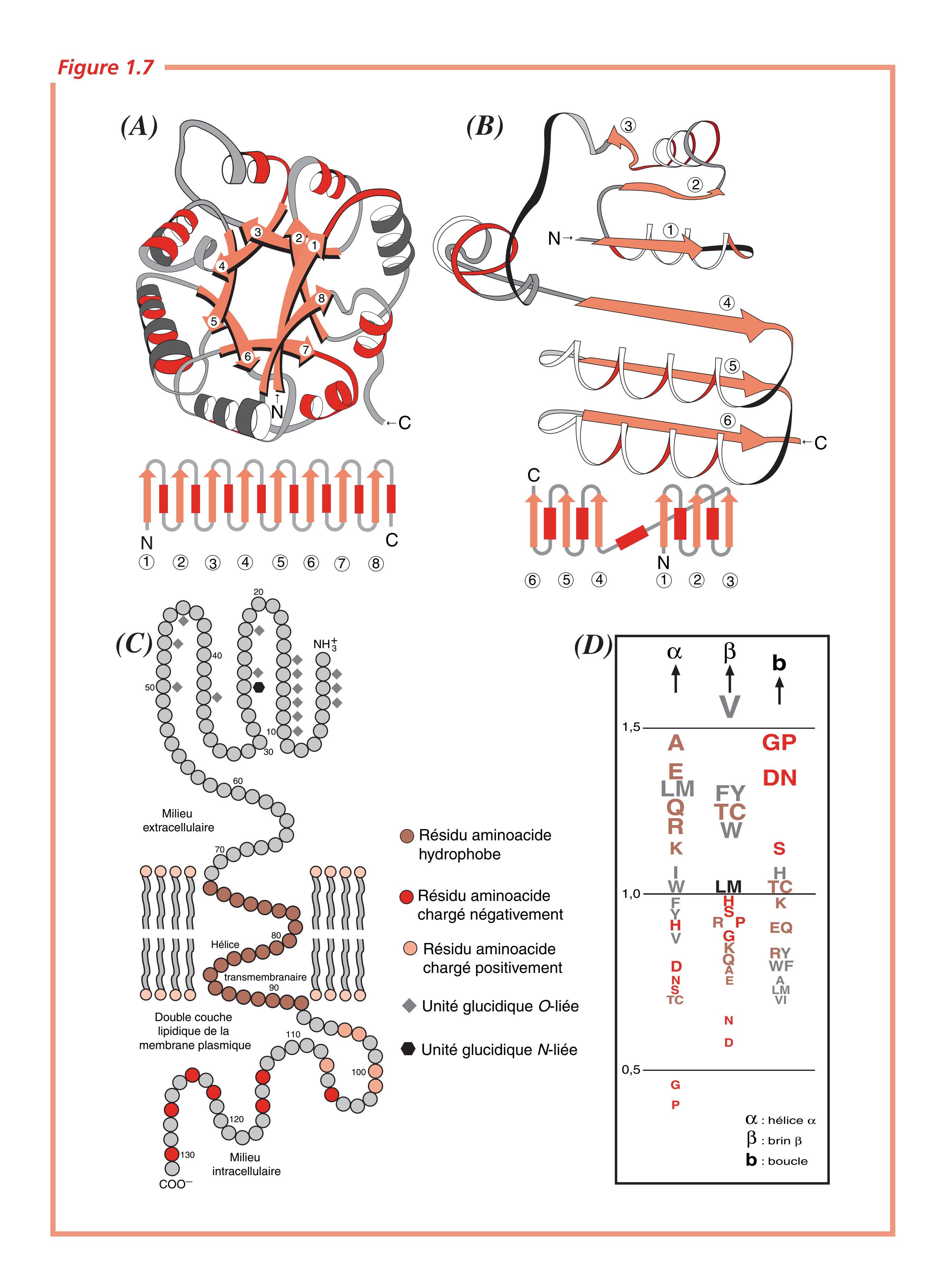
LES PROTÉINES TRANSMEMBRANAIRES

La plupart des membranes biologiques contiennent des protéines qui assurent la transduction des signaux ou le transport à travers ces membranes. Les protéines transmembranaires, ou intégrales, sont incluses, au moins partiellement, dans la double couche lipidique (*Figure 1.7C*). Les protéines transmembranaires monotopiques, telles que les récepteurs, ne contiennent qu'un seul segment intramembranaire. Les protéines transmembranaires polytopiques, telles que les transporteurs, en possèdent plusieurs. La structure secondaire des segments protéiques traversant une membrane est presque toujours une hélice α d'environ 20 résidus aminoacide qui se trouvent dans un environnement non polaire. Les hélices transmembranaires doivent donc être constituées pour l'essentiel de résidus apolaires ou polaires non chargés hydrophobes, tels que les mettent en évidence les courbes d'hydropathie. Elles peuvent cependant inclure quelques résidus chargés qui contribuent de façon essentielle au maintien de leur structure ou à l'accomplissement de leur fonction.

LA PRÉDICTION DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DES PROTÉINES EST-ELLE POSSIBLE ?

Dès lors que la séquence des résidus aminoacide d'une chaîne polypeptidique confère à cette dernière la propriété de morphogenèse autonome qui lui fait adopter spontanément sa conformation, on peut se demander si, connaissant la séquence des résidus aminoacide, c'est-à-dire la structure primaire d'une chaîne polypeptidique, il est possible de prédire la conformation de cette dernière, c'est-à-dire ses structures secondaire et tertiaire. En raison de la richesse actuelle des banques de données, le décryptage des informations structurales et fonctionnelles contenues au sein des séquences de protéines est devenu possible. D'après la *Figure 1.7D*, où la taille des lettres est proportionnelle à la propension des résidus aminoacide à former des états conformationnels α, β ou des boucles b, on constate que A, E, L, M, Q et R favorisent la formation d'une hélice, tandis que G et P interrompent cette

Figure 1.7


(A)
N
C
(B)
N→
←C
(C)
NH$_3^+$
Milieu extracellulaire
Hélice transmembranaire
Double couche lipidique de la membrane plasmique
Milieu intracellulaire
COO⁻
Résidu aminoacide hydrophobe
Résidu aminoacide chargé négativement
Résidu aminoacide chargé positivement
Unité glucidique *O*-liée
Unité glucidique *N*-liée
(D)
α
β
b
1,5
1,0
0,5
α : hélice α
β : brin β
b : boucle

dernière. De même, V, F, Y, T, C et W favorisent la formation d'un feuillet plissé tandis que P s'y adapte mal. G et P sont fréquemment présentes dans les coudes tandis que V n'y est que rarement rencontrée. Ainsi, les différents résidus aminoacides n'ont pas tous la même tendance à former des hélices α, des brins β ou des boucles, ni à occuper n'importe quelle position.

FLEXIBILITÉ CONFORMATIONNELLE DES PROTÉINES

Les protéines, comme toutes les autres macromolécules biologiques, ne sont pas rigides. Leur structure fluctue autour de son état d'équilibre et adopte de nombreuses conformations dont certaines sont même susceptibles d'affecter la forme globale de la molécule. Ces fluctuations jouent un rôle important dans les propriétés fonctionnelles des protéines. Elles leur confèrent la possibilité de s'adapter à un changement de milieu environnant ou de fixer des ligands d'une manière optimale, pour la catalyse par exemple. De plus, des changements conformationnels importants permettant la transition d'un état à un autre sont nécessaires pour réguler l'activité, par exemple le passage d'un état inactif à un état actif ou d'un état de faible affinité à un état de forte affinité. Ainsi, dans le cas des protéines allostériques, l'activité biologique est contrôlée par des mouvements globaux faisant suite aux interactions des substrats eux-mêmes ou de leurs produits, ou encore à la fixation d'effecteurs. En raison de la compacité atomique importante qui règne au sein des protéines, les changements conformationnels de grande amplitude s'accompagnent de déplacements concertés d'un grand nombre d'atomes. À ce propos, il convient de remarquer qu'une densité élevée des atomes à l'intérieur de la protéine et une relative rigidité de certains de ses segments peptidiques sont nécessaires à la transmission de mouvements à travers la molécule. Certaines protéines satisfont à ces deux conditions et assument la transmission vectorielle de mouvements.

LIAISONS ET INTERACTIONS DES PROTÉINES

Toutes les protéines assument leurs fonctions biologiques au moyen de liaisons ou d'interactions stéréospécifiques avec des ligands très divers : électrons, ions, molécules organiques ou biopolymères. Ainsi, dans une cellule, toute molécule a été liée au récepteur qui lui a permis d'y pénétrer ou à l'enzyme qui l'a produite et toute molécule sera liée au transporteur qui la dirigera vers sa destination ou à l'enzyme qui la transformera. Des protéines s'associent étroitement entre elles pour former de larges complexes dont la masse moléculaire peut atteindre des millions de daltons ; certaines s'unissent à des polysaccharides ou à des lipides pour participer à l'édification des membranes ; d'autres entrent en interaction avec le DNA pour contrôler sa réplication et son expression ou avec des RNA pour réguler la biosynthèse des protéines elles-mêmes. Certains complexes entre protéines sont permanents, et c'est le cas des protéines multimériques ou des complexes multienzymatiques ; d'autres sont transitoires, et c'est le cas des enzymes liés à leur inhibiteur protéique, ou des anticorps fixés à leur antigène protéique.

Les fonctions des protéines sont décrites par des réactions de liaison qui établissent une relation entre la quantité d'un ligand donné fixé sur la protéine et la concentration de ce ligand dans le milieu environnant la protéine. Ces réactions sont traduites par des courbes de liaison dont l'interprétation permet d'obtenir une analyse quantitative du processus de liaison. Plusieurs cas sont possibles, entre autres la liaison d'un ligand sur un seul site ou sur plusieurs sites identiques indépendants et la liaison, accompagnée d'interactions, d'un même ligand sur des sites multiples semblables ou de plusieurs ligands sur des sites différents.

LIAISON D'UN LIGAND SUR UN SEUL SITE

L'équation de la réaction d'un ligand X sur le site de liaison d'une protéine P s'écrit :

$$\mathrm{P} + \mathrm{X} \rightleftharpoons \mathrm{PX}$$

La constante d'équilibre, ou constante d'association K_a, est donnée par la loi d'action de masse :

$$K_a = \frac{[\mathrm{PX}]}{[\mathrm{PX}] \bullet [\mathrm{X}]}$$

où [PX], [P] et [X] sont les concentrations de PX, P et X, respectivement.

Le degré de liaison X est défini par les moles de X liées par mole de protéine :

$$X = \frac{[\mathrm{PX}]}{[\mathrm{P}] + [\mathrm{PX}]}$$

En remplaçant [PX] par sa valeur tirée de l'équation précédente, on a :

$$X = \frac{K_a [\mathrm{X}]}{1 + K_a [\mathrm{X}]}$$

D'après cette équation, X tend vers 0 lorsque [X] est faible et vers 1 lorsque [X] est forte. De plus, lorsque X = 1/2 (à demi-saturation), $K_a = 1/[\mathrm{X}]_{(1/2)}$; la constante d'association K_a a pour valeur l'inverse de celle de la concentration à demi-saturation $[\mathrm{X}]_{(1/2)}$. Ces propriétés sont illustrées dans la *Figure 1.8A*.

L'équation précédente s'écrit encore :

$$\frac{X}{1 - X} = K_a\,[X]$$

qui établit une relation hyperbolique entre la quantité *X* de ligand lié à une protéine et la concentration de ce ligand [X] dans le cas d'une réaction sur un seul site.

D'autres représentations peuvent être utilisées. Ainsi, la courbe donnant *X* en fonction de log[X] est fondamentale, car le logarithme de la concentration du ligand est proportionnel au potentiel chimique de ce ligand. Cette courbe est semblable à une courbe de titration. En effet, les données sont obtenues par une expérience de titration où la quantité de ligand lié est déterminée en fonction de la quantité de ligand libre ajoutée, tout comme les protons liés sont mesurés en fonction du pH, c'est-à-dire de la quantité de base ou d'acide ajoutée au système. Les données de l'exemple précédent sont représentées de cette façon dans la *Figure 1.8B*.

Un type de courbe différent, dit de Scatchard, est :

$$\frac{X}{[X]} = K_a - K_a X$$

Dans le cas de la liaison d'un ligand sur un seul site, la courbe de Scatchard donnant *X*/[X] en fonction de *X* est une droite représentée dans la *Figure 1.8C*.

Un autre type de courbe, dite de Hill, donne le logarithme du rapport X/(1 – X) des sites occupés *X* aux sites vides (1 – *X*) en fonction de log[X] :

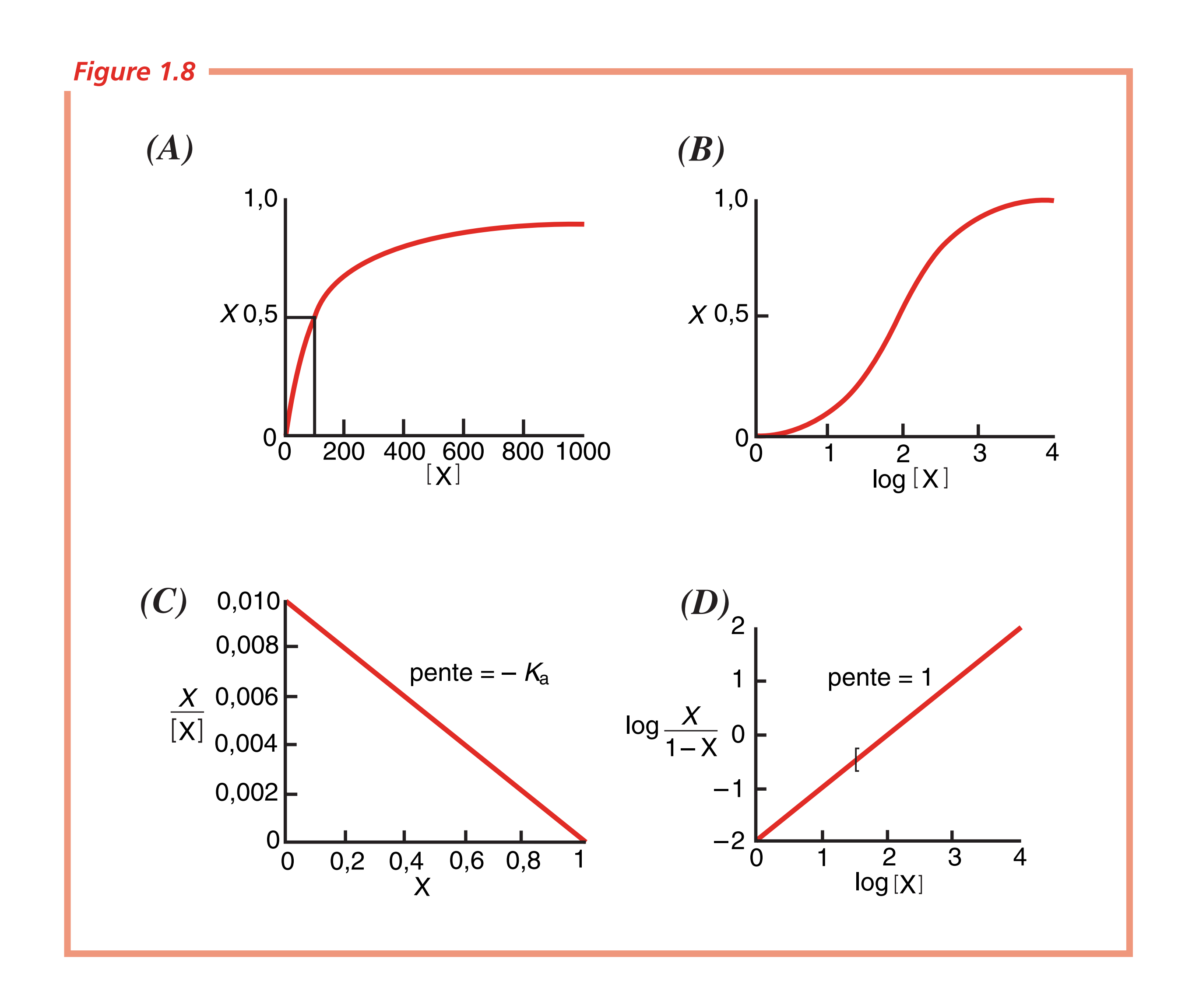
$$\log \frac{X}{1 - X} = \log K_a + \log\,[X]$$

Dans le cas de la liaison d'un ligand sur un seul site, cette représentation donne une droite de pente égale à 1 (*Figure 1.8D*). En pratique, la représentation de Hill est essentiellement utilisée pour analyser les liaisons coopératives.

La valeur de la constante d'association K_a est exprimée en unités de (concentration)$^{-1}$. Il est souvent plus facile, parce que plus intuitif, de considérer la constante de dissociation K_d qui est l'inverse de K_a et qui est exprimée en unités de concentration. Pour des concentrations de ligand libre inférieures à K_d, il y a peu de liaison sur la protéine. Pour une concentration égale à K_d, la moitié des molécules de protéine fixent une molécule de ligand. Une saturation de 90 % nécessite une concentration de ligand libre neuf fois plus grande que K_d et une saturation de 99 %, 99 fois supérieure à K_d. Les constantes K_a et K_d sont reliées à l'énergie libre de liaison de Gibbs, $\Delta G_{liaison}$, par la relation :

$$\Delta G_{liaison} = -\,RT \log K_a = RT \log K_d$$

Figure 1.8



La liaison d'un ligand sur un site de liaison permet de comprendre la fonction de nombre de protéines, tels que les enzymes michaeliens qui assurent la transformation des substrats par les voies métaboliques ou les myoglobines qui assument le stockage de l'oxygène au sein des tissus musculaires.

LIAISON COOPÉRATIVE D'UN MÊME LIGAND SUR DES SITES MULTIPLES SEMBLABLES : INTERACTIONS HOMOTROPIQUES

La fixation d'un ligand sur un site d'une protéine peut augmenter ou diminuer les affinités des autres sites ; en d'autres termes, cette coopérativité peut être positive ou négative. Lorsque les sites sont essentiellement identiques, les interactions sont dites homotropiques. Une mesure de la coopérativité est donnée par la comparaison de la pente de la courbe de liaison observée avec celle d'une courbe prévue pour des sites de liaison indépendants. La représentation de Hill est bien adaptée à cette comparaison.

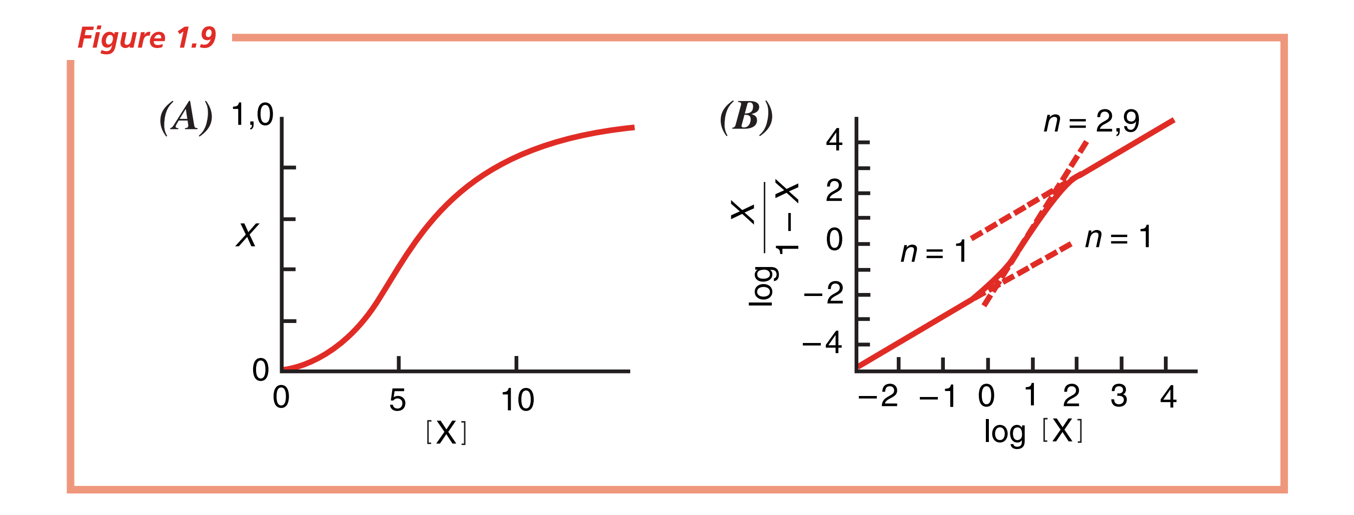
La coopérativité positive se traduit par une courbe de liaison donnant X en fonction de [X] non plus hyperbolique, mais en forme de S, ou sigmoïde (*Figure 1.9A*), en raison de l'augmentation de l'affinité des différents sites pour les molécules de ligand au fur et à mesure que ces dernières se fixent sur la molécule protéique. Suivant la représentation de Hill, l'effet coopératif positif conduit à une courbe en forme de S dont la partie centrale est assimilable à une droite. Le coefficient de Hill, qui est la pente de la courbe de Hill en son milieu, est une caractéristique du système qui donne une mesure directe de son degré de coopérativité (*Figure 1.9B*). La coopérativité négative donne des courbes de Hill dont les pentes sont inférieures à l'unité, en raison de la diminution de l'affinité des différents sites pour les molécules de ligand au fur et à mesure que ces dernières se fixent sur la protéine.

L'étude de la coopérativité a apporté des données sur la régulation spécifique de nombreux processus biologiques fondamentaux. Ainsi, l'activité de la plupart des voies métaboliques est contrôlée par des enzymes en position clé dont l'action est due, pour partie, à une coopérativité positive comme dans la phosphofructokinase (p. 164) ou l'aspartate transcarbamylase (p. 150), ou négative comme dans la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (p. 170) entre les sites de fixation du substrat appartenant aux différentes sous-unités qui constituent ces enzymes. De même, l'apport d'oxygène au sein des tissus par les hémoglobines est régulé, pour partie, par la coopérativité positive entre les sites de fixation de l'oxygène des quatre sous-unités qui constituent ces protéines.

LIAISON DE PLUSIEURS LIGANDS SUR DES SITES DIFFÉRENTS : INTERACTIONS HÉTÉROTROPIQUES

La liaison d'un ligand peut affecter la liaison de ligands différents sur d'autres sites de la même protéine. Ces interactions sont dites hétérotropiques. Elles sont mises en évidence et étudiées par la variation de la concentration d'un ligand, indépendamment de celles des autres. Associées aux interactions homotropiques, elles participent spécifiquement, elles aussi, au contrôle de processus biologiques fondamentaux où elles jouent le rôle d'effecteurs, activateurs ou inhibiteurs. Les mécanismes selon lesquels elles gouvernent et affinent la régulation de certains systèmes seront décrits dans divers chapitres de ce livre.

Figure 1.9



CONCEPT D'ALLOSTÉRIE

Comme il vient d'être exposé, une première étape de l'étude de la liaison d'un ou de plusieurs ligands sur une protéine a pu être réalisée par une approche purement phénoménologique faisant appel à l'application de la loi d'action de masse. Par la suite, une étude des phénomènes de liaison et d'interactions coopératives a pu être menée en termes de mécanismes moléculaires applicables aux macromolécules et a conduit au concept d'allostérie.

Tout d'abord, des études physiques de la structure des hémoglobines ont permis d'émettre l'idée que des changements conformationnels contrôlés par des ligands pouvaient expliquer les phénomènes de coopérativité homotropique ou hétérotropique constatés lors de l'oxygénation de l'hémoglobine (p. 404). Par ailleurs, on a décrit l'effet sur la réactivité de certains enzymes d'effecteurs, activateurs ou inhibiteurs, dits allostériques qui n'ont aucune analogie stérique avec le substrat (p. 148). Il est ensuite apparu que la liaison des effecteurs allostériques se faisait sur des sites autres que le site actif et induisait des changements conformationnels, ou transitions allostériques, réversibles dans la protéine enzymatique. On a alors proposé un usage plus large du terme allostérie, qui inclut les idées d'équilibre entre des formes macromoléculaires et d'influence d'un ligand sur ces équilibres. Des équations d'interactions décrivant l'effet de la concentration du ligand sur le rapport des différentes conformations ont été établies et deux modèles spécifiques, le modèle concerté et le modèle séquentiel, ont été décrits.

MODÈLE CONCERTÉ

Le modèle concerté ou modèle MWC (Monod, Wyman, Changeux) est fondé sur l'équilibre entre deux formes macromoléculaires : T (de *tense*, tendue, contrainte par l'association des sous-unités entre elles) et R (de *relaxed*, relâchée) ; il contient l'essence même de la manière dont une fonction peut être exprimée en termes de changements structuraux. Intrinsèquement, c'est un modèle thermodynamique basé sur les principes d'action de masse qui utilise les propriétés énergétiques différentes des structures proposées que peuvent assumer les macromolécules.

Selon le modèle MWC (*Figure 1.10A*), les deux conformations coexistent, même en l'absence de ligand, avec une constante d'équilibre L entre T_0 et R_0. La forme T_0 est normalement favorisée ($L < 1$) et la protéine a donc une affinité relativement faible pour la première molécule de ligand. La conformation R a une affinité plus grande d'un facteur c que celle de la conformation T parce que changement conformationnel et fixation d'un ligand sont liés. Les molécules de ligand se fixent donc de préférence à R, ce qui déplace l'équilibre vers l'état R. L'équilibre conformationnel entre les deux conformations possédant une seule molécule de ligand est donné par le facteur Lc. Les autres sites vacants sur toutes les molécules R_1 sont tous sous la forme de haute affinité et donc l'affinité moyenne des sites vacants de la population entière est augmentée. Le même phénomène se reproduit lors de la liaison suivante d'autres molécules de ligand, ce qui explique les interactions homotropiques positives.

Dans le modèle MWC, des interactions hétérotropiques impliquant d'autres ligands modulateurs peuvent avoir lieu car ces derniers se fixent de préférence soit sur les états T, soit sur les états R. Ainsi, l'affinité pour le premier ligand est diminuée par les molécules inhibitrices qui se lient de préférence à l'état T et déplacent donc l'équilibre vers l'état T.

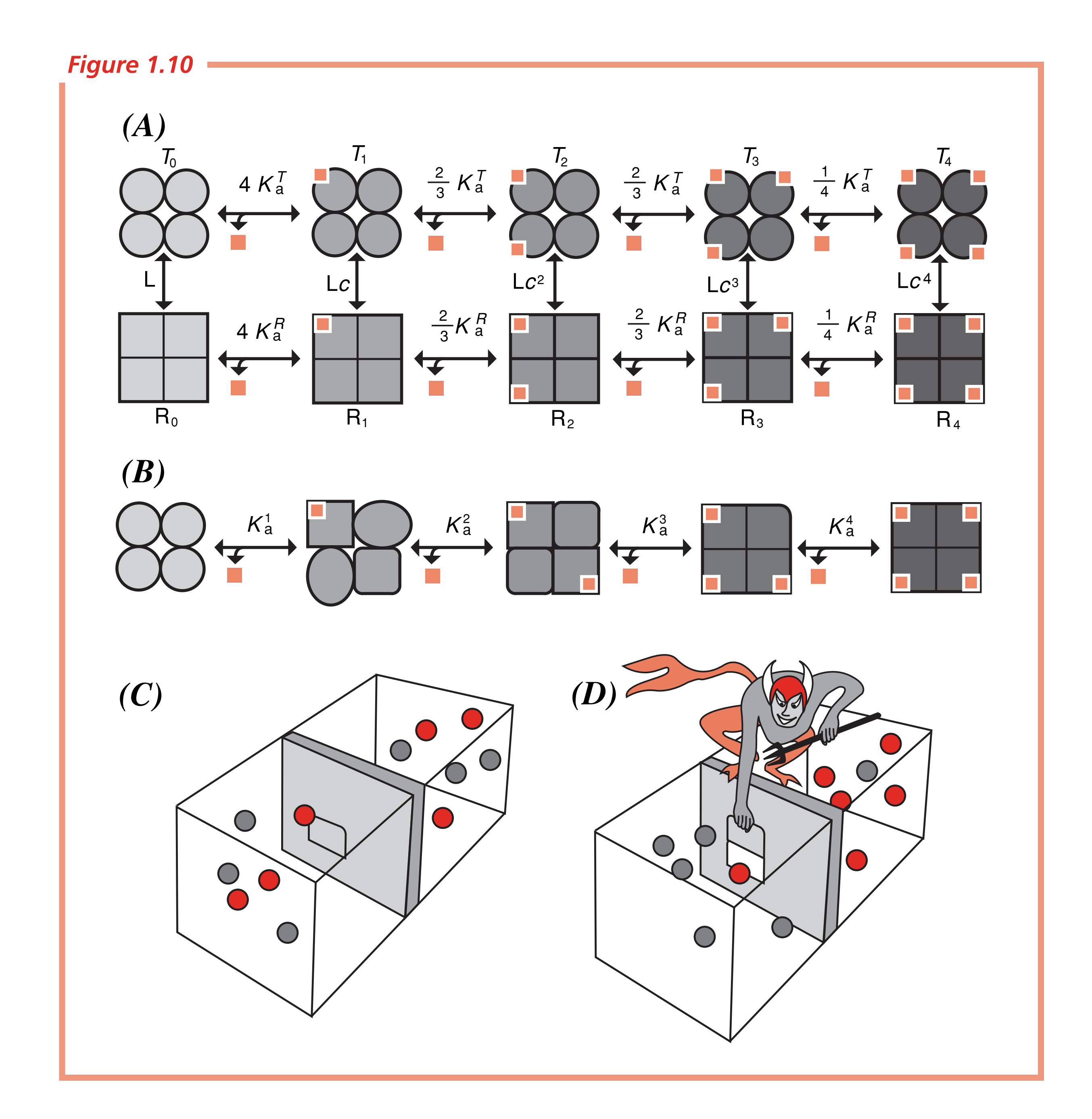
MODÈLE SÉQUENTIEL

Le modèle séquentiel ou modèle KNF (Koshland, Nemethy, Filmer) est fondé sur la notion qu'une protéine est suffisamment flexible pour que la liaison d'un ligand au niveau d'un site modifie directement la conformation d'un autre site de la molécule protéique et affecte l'affinité de ce dernier site pour son ligand (*Figure 1.10B*). S'il en est ainsi, pratiquement tous les types d'interactions allostériques sont possibles et ne dépendent que des changements conformationnels induits au niveau d'un site par la liaison d'un ligand sur un autre. Ces changements et leurs effets sur l'affinité des sites apparaissent séquentiellement, au fur et à mesure que les ligands se fixent.

LES PROTÉINES SONT-ELLES DES DÉMONS DE MAXWELL ?

Les protéines reconnaissent les ligands auxquels elles s'associent avec une prodigieuse spécificité, comme si elles étaient guidées par une fonction cognitive. C'est une telle fonction que Maxwell attribuait aussi à son démon. Les protéines peuvent-elles être alors comparées au démon de Maxwell ? Maxwell imaginait un démon surveillant un orifice de communication microscopique entre deux enceintes remplies initialement d'un gaz quelconque, à la même température et à la même pression (*Figure 1.10C*). Le démon, en manœuvrant une trappe idéale sans frottement, pouvait ouvrir ou fermer l'orifice à sa guise (*Figure 1.10D*). Il pouvait ainsi choisir de laisser passer dans un sens uniquement les molécules rapides, donc de haute énergie, et dans l'autre sens uniquement les molécules lentes, donc de faible énergie. Après un certain temps, une différence de température et de pression s'établissait donc entre les deux enceintes, l'une se réchauffant, l'autre se refroidissant. Cette différence entre les deux enceintes permettait alors d'effectuer un travail et pourtant le démon, lui, n'en avait fourni aucun. Il semblait donc que le démon avait le pouvoir de faire décroître l'entropie du gaz, et ainsi de violer le second principe de la thermodynamique, par le seul

Figure 1.10



exercice de sa fonction cognitive. Les protéines, qui possèdent le pouvoir de reconnaître spécifiquement les molécules, peuvent-elles créer un ordre, en apparente contradiction avec le second principe, comme le faisait le démon ?

Le démon a été exorcisé, et le paradoxe levé en considérant que pour exercer ses fonctions le démon devait disposer d'informations sur les molécules, telles que localisation, vitesse et direction. Pour obtenir ces informations, il doit nécessairement dépenser une certaine quantité d'énergie qui, dans le bilan de l'opération, doit toujours être supérieure, ou au plus égale, au gain d'entropie résultant de sa perspicacité. La théorie de l'information montre, en effet, qu'on ne peut rien obtenir pour rien, même pas de l'information.

Pour obtenir de l'information de leur environnement, les organismes doivent dépenser de l'énergie pour construire et mettre en œuvre des systèmes sensoriels. Si cette information doit être transmise d'une génération à la suivante, de l'énergie doit être consacrée à son codage dans des messages génétiques, au contrôle de son exactitude, à sa transmission et finalement à sa traduction sans possibilité d'erreur. En contrepartie, les protéines sont les machines qui utilisent cette information sous forme de reconnaissance stéréospécifique ; les enzymes, par exemple, s'en servent pour abaisser la barrière de l'énergie d'activation (p. 104). Ainsi, les protéines qui exercent à l'échelle microscopique une fonction créatrice d'ordre, le font aux dépens du potentiel chimique de tout un système biologique et fonctionnent exactement comme le démon de Maxwell revu par Szilard et Brillouin.

CLASSIFICATION FONCTIONNELLE DES PROTÉINES

Les protéines peuvent être classées selon leurs liaisons stéréospécifiques et les conséquences fonctionnelles qui en résultent.

Les enzymes reconnaissent spécifiquement leurs substrats ; ils catalysent et régulent les réactions du métabolisme.

Les déshydrogénases NAD– ou FAD-dépendantes acceptent spécifiquement certains hydrogènes de leurs substrats et cèdent des électrons de haut potentiel aux pompes à protons de la chaîne respiratoire mitochondriale qui les transfèrent à l'oxygène moléculaire qui est alors réduit ; ce processus exergonique est couplé à la formation endergonique d'un potentiel chimique qui permet la synthèse d'ATP par l'ATP synthase, et donc la création d'énergie directement utilisable par la cellule.

Les hémoglobines et les myoglobines fixent réversiblement l'oxygène moléculaire ; les premières permettent le transport de l'oxygène du milieu extérieur aux tissus, les secondes son stockage dans les muscles.

Les protéines contractiles des fibres musculaires, des cils ou des flagelles interagissent entre elles pour créer une force contractile ou motrice.

Les protéines du système immunitaire reconnaissent sélectivement leurs antigènes et protègent les êtres vivants des agressions des micro-organismes ou des substances étrangères.

De nombreux facteurs protéiques s'associent aux gènes pour réguler leur réplication et leur transcription.

APPENDICE : STRUCTURES X ET RMN DES PROTÉINES

Pour atteindre la structure tridimensionnelle d'une protéine, il est nécessaire de mettre en œuvre des méthodes physiques puissantes. Parmi celles-ci, la cristallographie par diffraction des rayons X et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution apportent des données décisives et complémentaires. Ces deux techniques donnent des informations différentes sur des molécules placées dans des environnements différents. En cristallographie par diffraction des rayons X, la protéine est bloquée dans un cristal et chaque réflexion contient une information sur ses atomes de carbone, d'oxygène et d'azote. En RMN, la protéine en solution est libre et les intensités NOE (*Nuclear Overhauser Effect*)

correspondent à des interactions dipolaires ; chaque résonance contient une information locale entre atomes proches dans l'espace.

En dépit de ces différences, l'étude de structures de protéines pour lesquelles on dispose à la fois des données X et RMN montre que les reploiements globaux sont très semblables. De plus, la comparaison des informations apportées par ces deux techniques donne une image détaillée de la structure macromoléculaire et de sa dynamique et ouvre ainsi de larges perspectives pour l'établissement des relations entre la structure et la fonction et pour la compréhension du mécanisme d'action des protéines. À ce jour, les coordonnées atomiques de plus de 14 000 structures protéiques, déterminées par voie expérimentale, X ou RMN, sont déposées dans la PDB (*Brookhaven Protein Data Bank*) et exploitables.

Chapitre 2

Nucléotides et acides nucléiques

Tout comme les protéines sont de longs polymères linéaires d'aminoacides, unis par des liaisons peptidiques, dont la conformation est déterminée par la nature et la séquence de ces derniers, les acides nucléiques, DNA et RNA, sont de longs polymères linéaires de nucléotides, unis par des liaisons phosphodiester, dont la conformation est, elle aussi, fonction de l'ose et de la nature et de la séquence des bases des nucléotides constituants. Deux chaînes de DNA ou deux segments d'une chaîne de RNA sont susceptibles de s'associer grâce à des appariements de leurs bases par des liaisons hydrogène de type Watson-Crick, ce dont il résulte une structure secondaire et une structure tertiaire adaptées aux fonctions, et éventuellement, à la duplication des acides nucléiques.

L'information génétique est stockée dans la séquence des bases des chaînes polynucléotidiques qui constituent le génome. Au début de l'évolution, le RNA a été le matériel génétique ; il l'est encore chez certains Virus (Virus à RNA). Actuellement, le DNA détient l'information nécessaire à la synthèse des protéines chez nombre de Virus (Virus à DNA) et dans toutes les cellules procaryotes ou eucaryotes. La séquence des bases du DNA qui constitue les gènes détermine la séquence des aminoacides des protéines qui forment le protéome, mais elle ne le fait pas de façon directe ; des molécules de RNA du transcriptome servent d'intermédiaires entre le génome et le protéome. L'information génétique contenue dans le DNA est tout d'abord transcrite dans des molécules de RNA dénommées RNA messager (mRNA), puis traduite en molécules de protéines. D'autres molécules de RNA, telles que celles des RNA de transfert (tRNA) et du RNA ribosomique (rRNA), qui interviennent lors de la synthèse des protéines, sont aussi partie intégrante du transcriptome. Le flux de l'information génétique, lors de l'expression des gènes dans une cellule normale, peut être représenté schématiquement par la suite :



où la relation entre la séquence des bases du DNA et celle des aminoacides des protéines est définie par un code génétique presque universel.

LES NUCLÉOSIDES

Les nucléosides (*Figure 2.1A*) sont constitués d'un pentose, le D-ribofuranose dans les ribonucléosides ou le 2-désoxy-D-ribofuranose dans les désoxyribonucléosides, uni à une purine telle que l'adénine (A) ou la guanine (G) (*Figure 2.1B*), ou une pyrimidine telle que la cytosine (C), l'uracile (U) ou la thymine (T) (*Figure 2.1C*), grâce à une liaison β-glycosidique établie entre l'atome d'azote *N*-9 des purines ou *N*-1 des pyrimidines et le carbone *C*-1' du pentose. Chez les êtres vivants, on identifie essentiellement quatre ribonucléosides, l'adénosine, la guanosine, la cytidine et l'uridine, et quatre désoxyribonucléosides, la désoxyadénosine, la désoxyguanosine, la désoxycytidine et la thymidine où le préfixe désoxy est généralement omis parce que dans la cellule la thymine est toujours unie au désoxyribose (*Tableau 2.1*).

Le cycle du ribofuranose peut se présenter sous quatre conformations possibles : *C*-2' endo, *C*-2' exo, *C*-3' endo et *C*-3' exo (*Figure 2.1D*) ; dans tous les cas, l'un des deux atomes de carbone, *C*-2' ou *C*-3', est hors du plan défini par les quatre autres atomes du cycle, du même côté que l'atome *C*-5' (configuration endo) ou du côté opposé (configuration exo).

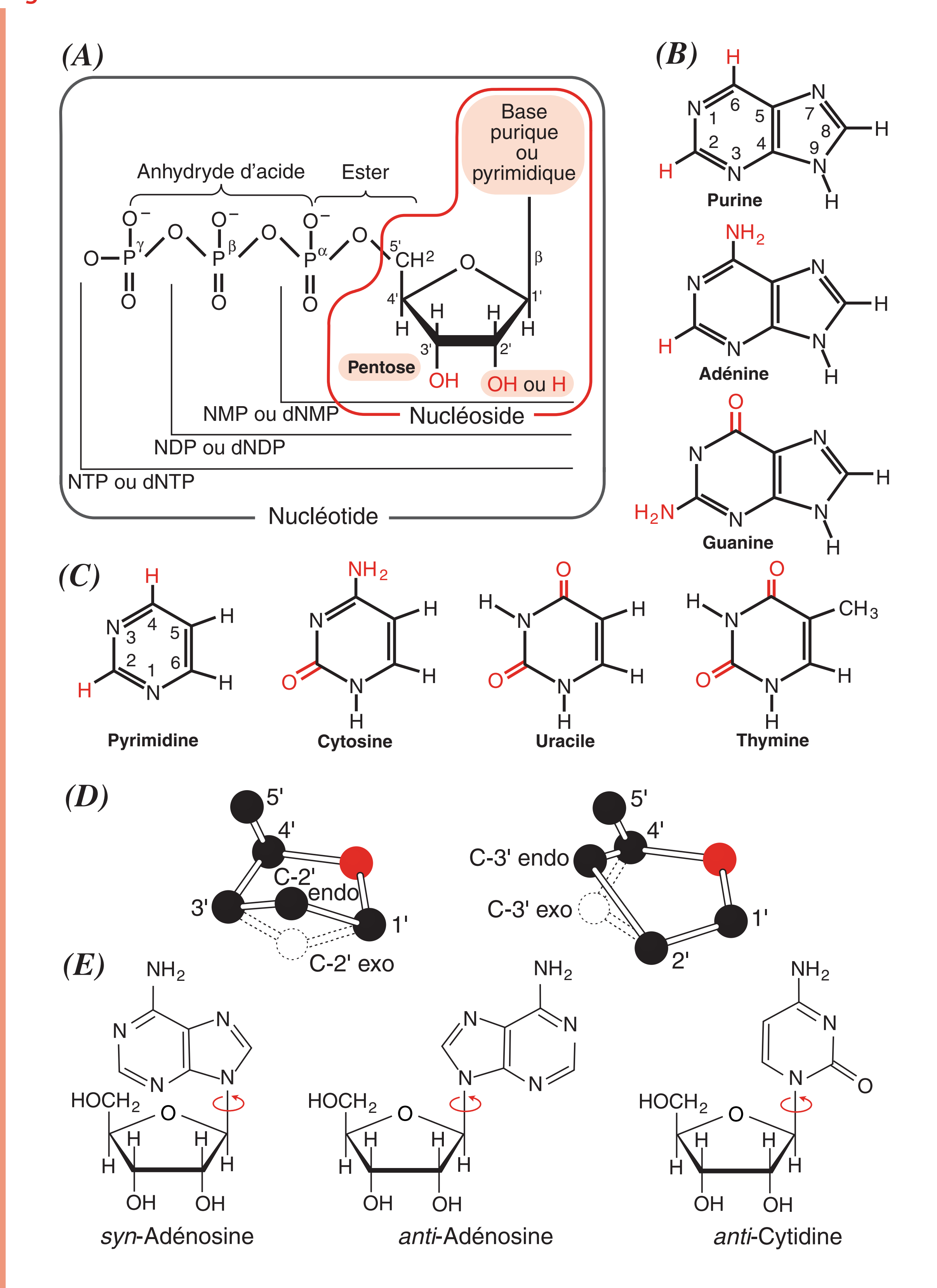
Les purines et les pyrimidines sont des molécules hétérocycliques légèrement basiques et très conjuguées Des résonances entre les atomes de leur cycle donnent à la plupart des liaisons un caractère de double liaison partielle ce dont il résulte que les purines sont des molécules presque planes avec cependant une très légère distorsion et les pyrimidines des molécules rigoureusement planes. Une autre conséquence de la résonance est leur forte absorption dans l'ultraviolet, à 260 nm environ. Dans les nucléosides puriques, seules deux conformations de la liaison glycosodique sont stériquement permises, *syn* et *anti* ; les nucléosides pyrimidiques se présentent généralement dans la configuration *anti* (*Figure 2.1E*).

LES NUCLÉOTIDES

Les nucléotides sont des nucléosides phosphorylés (*Figure 2.1A*). Les nucléotides cellulaires sont les ribonucléosides et les désoxyribonucléosides 5' mono-, di- ou triphosphate, abrégés en NMP, NDP, NTP, dNMP, dNDP et dNTP, respectivement (d pour désoxy). Les groupes phosphate sont repérés par les lettres α, β et γ. Le ribose ou le 2-désoxyribose et le phosphate α sont unis par une liaison ester $\Delta G°' = -10$ kJ mol^{-1} et les phosphates α, β et γ par deux liaisons anhydride d'acide phosphorique $\Delta G°' = -30$ kJ mol^{-1}.

Les principaux ribonucléotides cellulaires sont l'adénosine-, le guanosine-, le cytidine- et l'uridine 5'-monophosphate, abrégés en AMP, GMP, CMP et UMP, respectivement ; l'adénosine-, le guanosine-, le cytidine- et l'uridine 5'-diphosphate, ou ADP, GDP, CDP et UDP ; l'adénosine , le guanosine-, le cytidine- et l'uridine 5'-triphosphate, ou ATP, GTP, CTP et UTP. Les désoxyribonucléotides correspondant sont précédés de la lettre d, sauf pour les dérivés de la thymidine étant donné que dans la cellule la thymine n'est unie qu'au désoxyribose (*Tableau 2.1*).

Figure 2.1


(A)
Anhydryde d'acide
Ester
Base purique ou pyrimidique
Pentose
OH
OH ou H
NMP ou dNMP
Nucléoside
NDP ou dNDP
NTP ou dNTP
Nucléotide
(B)
Purine
Adénine
Guanine
(C)
Pyrimidine
Cytosine
Uracile
Thymine
(D)
C-2' endo
C-2' exo
C-3' endo
C-3' exo
(E)
syn-Adénosine
anti-Adénosine
anti-Cytidine

Les ribonucléosides et les désoxyribonucléosides 5’-di- ou triphosphate sont des acides relativement forts dont les groupes phosphoryle se dissocient en libérant trois ou quatre protons, respectivement. Les anions forment des complexes stables avec les cations divalents tels que Mg^{2+} et Ca^{2+} (*Figure 2.2A et B*).

Les nucléotides jouent des rôles centraux dans le métabolisme : l’ATP est l’unité énergétique dans la plupart des processus cellulaires (p. 237), le GTP est une source d’énergie essentielle dans la synthèse des protéines (p. 386), l’UDP-glucose est l’intermédiaire activé dans le métabolisme du galactose (p. 174) et dans la synthèse des polyosides (p. 178), tout comme le CDP-diacylglycérol est l’intermédiaire activé dans la synthèse des phospholipides.

Des nucléotides adényliques sont des constituants de cofacteurs enzymatiques, tels que le NAD^+, le $NADP^+$, le FAD et le CoA.

Enfin, l’ATP, le GTP, le CTP et l’UTP sont les substrats dans la synthèse des acides ribonucléiques (RNA), tandis que le dATP, le dGTP, le dCTP et le TTP sont les substrats dans la synthèse de l’acide désoxyribonucléique (DNA).

Les cellules possèdent aussi des nucléotides cycliques tels que l’adénosine 3’,5’-phosphate (AMP cyclique ou cAMP) et le guanosine 3’,5’-phosphate (GMP cyclique ou cGMP) (*Figure 2.2C*) qui interviennent dans la régulation du métabolisme.

LIAISON PHOSPHODIESTER ET ACIDES NUCLÉIQUES

Des ribonucléotides sont les unités structurales des RNA et des désoxyribonucléotides celles du DNA. Dans les RNA et dans le DNA, les nucléotides s’unissent les uns aux autres par une liaison où le groupe 5’-phosphate de l’un estérifie le groupe 3’-hydroxyle de l’autre. L’acide phosphorique en 5’ engage donc deux de ses fonctions acide dans une liaison dite, pour cette raison, phosphodiester, sa troisième fonction acide demeurant libre ; au pH physiologique, cette dernière est complètement ionisée et chargée négativement (*Figure 2.2D*). Les enchaînements de ribonucléotides ou de désoxyribonucléotides au moyen de liaisons de ce type présentent une extrémité 5’ où un groupe 5’-phosphate a deux de ses fonctions acide libres et une extrémité 3’ où un groupe 3’ hydroxyle est libre. Ainsi, une chaîne polynucléotidique, tout comme une chaîne polypeptique, présente une polarité. Par convention, on écrit et lit toujours une chaîne polynucléotidique dans le sens 5’ P $\rightarrow$ 3’ OH ; ACG et GCA correspondent donc à des composés différents.

Au sein des cellules, les charges négatives des acides nucléiques sont habituellement neutralisées par des interactions avec des ions métalliques tels que Mg^{2+} ou des protéines qui contiennent de nombreux résidus basiques, tels que ceux de l’arginine ou de la lysine, et sont donc chargées positivement. Les bases puriques et les bases pyrimidiques sont susceptibles de s’empiler parallèlement les unes sur les autres en raison d’une combinaison de forces de van der Waals et d’interactions dipolaires.

Tableau 2.1

Nomenclature des principaux nucléosides et nucléotides.

Base	**Ribonucléosides et désoxyribonucléosides**	**Ribonucléosides et désoxyribonucléosides 5'-mono-, di-, tri-phophate** (abréviations)		
Purines				
Adénine(A)	Adénosine	AMP	ADP	ATP
	Désoxyadénosine	dAMP	dADP	dATP
Guanine(G)	Guanosine	GMP	GDP	GTP
	Désoxyguanosine	dGMP	dGDP	dGTP
Pyrimidines				
Cytosine (C)	Cytidine	CMP	CDP	CTP
	Désoxycytidine	dCMP	dCDP	dCTP
Uracile (U)	Uridine	UMP	UDP	UTP
Thymine (T)	Thymidine	TMP	TDP	TTP

Figure 2.2

(A)

Complexes magnésium-ATP

(B)

(C)

cAMP, cGMP

(D)

RNA

DNA

Vers l'extrémité 5'

Vers l'extrémité 3'

ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE OU DNA

Une chaîne (ou brin) de DNA est un polymère linéaire de désoxyribonucléotides unis par des liaisons phosphodiester ; les bases y sont l'adénine (A), la guanine (G), la cytosine (C) et la thymine (T) (*Figure 2.3A*). Erwin Chargaff a déterminé que dans le DNA d'une cellule donnée, A et T sont en quantités équimoléculaires, qu'il en est de même pour G et C et que le rapport des purines aux pyrimidines est égal à 1 (*Figure 2.3B*). S'appuyant sur ces données et sur les diagrammes de diffraction de rayons X de fibres de DNA obtenus par Rosalind Franklin et Maurice Wilkins, James Watson et Francis Crick ont proposé un modèle de DNA des cellules procaryotes et des cellules eucaryotes en double hélice droite où deux chaînes antiparallèles s'enroulent l'une autour de l'autre avec, à l'intérieur, un appariement spécifique au moyen de liaisons hydrogène des bases puriques et pyrimidiques A-T et G-C qui sont presque perpendiculaires à l'axe de l'hélice, et, à l'extérieur, la formation d'un squelette ose-phosphate (*Figure 2.3B*). La structure en double hélice du DNA suggère comment l'information génétique est stockée et répliquée (p. 341).

Le squelette ose-phosphate délimite des sillons (*Figure 2.3C*) ; ces derniers sont de deux types caractérisés par leur largeur : le grand sillon, de 12 Å de large, et le petit sillon, de 6 Å de large. La largeur différente des sillons reflète l'asymétrie de la liaison des paires de bases aux cycles des désoxyriboses. Le petit sillon contient le *O*-2 d'une pyrimidine et le *N*-3 d'une purine d'une paire de bases ; le grand sillon se situe sur le côté opposé de la paire. Chaque sillon est bordé par les bases dont certains atomes sont potentiellement donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène. Ces derniers sont accessibles de l'extérieur et assurent la reconnaissance spécifique du DNA par les protéines ; les dimensions du grand sillon le rendent plus accessible que le petit sillon à des interactions avec ces dernières.

Figure 2.3

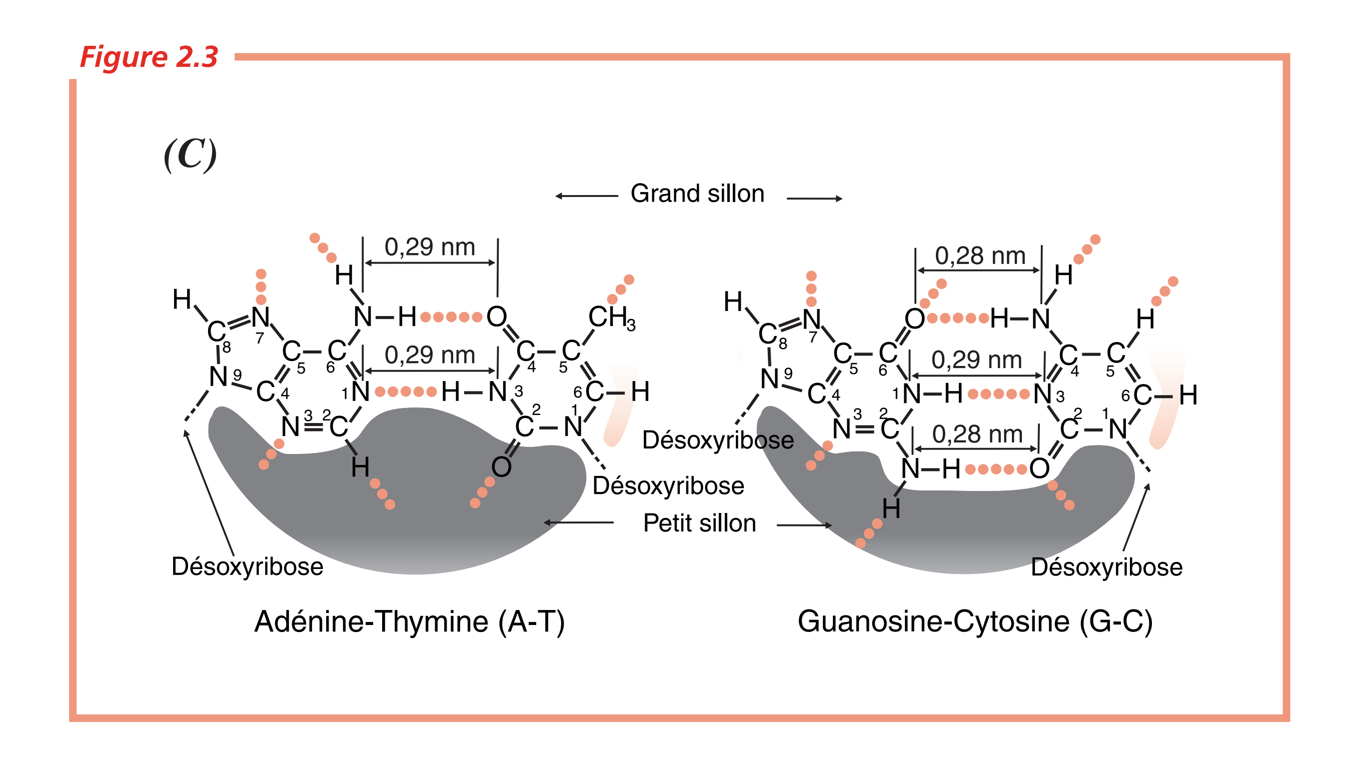


Figure 2.3

(A)

Vers l'extrémité 5'

Base

O

3'

H

O

P

O

5'

O

Base

O

DNA-B (simple brin)

3'

H

O

O

P

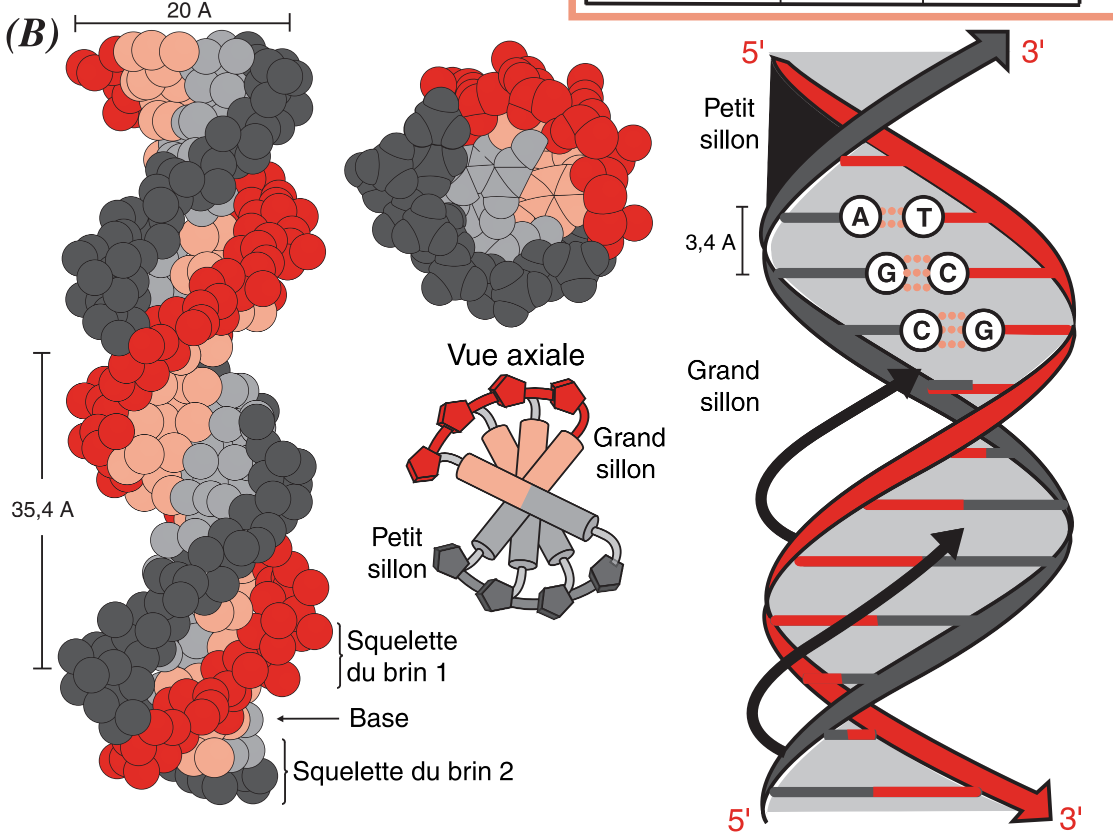
O

Vers l'extrémité 3'

Tableau 2.2

Composition en bases du DNA de diverses espèces

Espèces	A : T	G : C
Homme	1,00	1,00
Saumon	1,02	1,02
Blé	1,00	0,97
Levure	1,03	1,02
E. coli	1,09	0,99



Une chaîne polynucléotique est représentée en rouge, l'autre en gris. Les bases puriques ou pyrimidiques sont en couleurs plus claires que celles du squelette ose-phosphate. La structure se répète tout le long de l'axe de l'hélice à intervalle de 35,4 Å, ce qui correspond à 10,5 nucléotides environ sur chaque chaîne.

FORMES TRIDIMENSIONNELLES ALTERNATIVES DU DNA

Le modèle décrit par Watson et Crick est celui du DNA-B qui est la forme essentielle du DNA dans les conditions physiologiques. Les diagrammes de diffraction de rayons X sur lesquels il est fondé représentaient une disposition moyenne des résidus constituants du DNA. Une analyse de cristaux d'un dodécamère synthétique a révélé que si la structure d'ensemble correspond bien au modèle de Watson et Crick, elle n'est pas uniforme et présente d'assez grandes déviations par rapport à la structure idéale décrite initialement. Entre autres, les paires de bases ne sont pas rigoureusement coplanaires mais se disposent comme les pales d'une hélice, ce qui augmente l'empilement (*Figure 2.4A*). Ces variations locales sont largement fonction de la séquence des bases.

Les diagrammes de diffraction de rayons X de fibres de DNA déshydratées ont révélé une forme différente du DNA, dit DNA-A, qui apparaît lorsque l'humidité est inférieure à 75 %. Tout comme le DNA-B, le DNA-A est une double hélice droite de brins antiparallèles unis par des appariements de base de type Watson-Crick ; cependant cette hélice est plus large et plus courte que l'hélice B et les bases sont inclinées de 19° par rapport à la perpendiculaire à l'axe de l'hélice ; de plus, la conformation des désoxyriboses est alors du type

Tableau 2.3

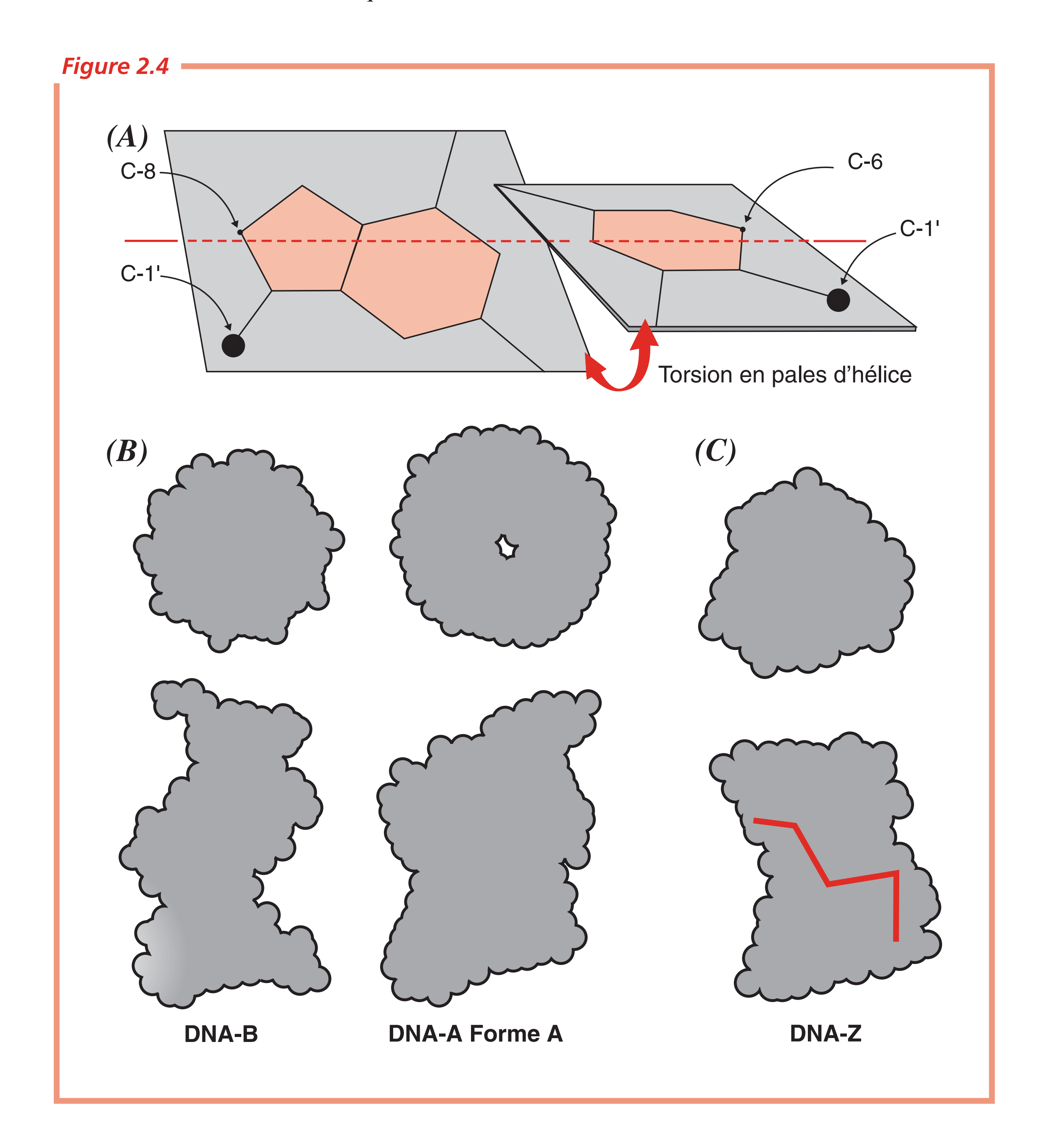
Comparaison des DNA-A, B et Z

Type d'hélice	A	B	Z
Forme	Large	Intermédiaire	Étroite
Diamètre de l'hélice	≃ 26 A	≃ 20 A	≃ 18 A
Sens de l'hélice	Droite	Droite	Gauche
Pas de l'hélice	25,3 A	35,4 A	45,6 A
Paires de bases par tour d'hélice	11	10,5	12
Inclinaison des paires de bases par rapport à la normale à l'axe de l'hélice	≃ 20	≃ 6	≃ 7
Conformation de la liaison glycosidique	Anti	Anti	Anti pour les pyrimidines, syn pour les purines
Conformation de l'ose	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo pour les pyrimidines C-3' endo pour les purines
Grand sillon	Étroit et profond	Large et profond	Plat
Petit sillon	Très large et peu profond	Étroit et assez profond	Très étroit et profond

C-3' endo (p. 58) et non pas C-2' endo ; le grand sillon y est étroit et très profond et le petit sillon très large et peu profond (*Figure 2.4B*).

Des oligonucléotides courts de type dCGCGCG, dont la séquence présente des pyrimidines et des purines alternées, adoptent une forme dite DNA-Z où l'hélice est gauche et le squelette ose-phosphate en zigzag (d'où le terme de DNA-Z) (*Figure 2.4C*). Le grand sillon y est plat et le petit sillon très étroit et profond. Le rôle biologique du Z-DNA n'est pas encore connu. Les caractéristiques des DNA-A, -B et -Z sont résumées dans le *Tableau 2.3*.

Figure 2.4



ACIDES RIBONUCLÉIQUES OU RNA

Une chaîne (ou brin) de RNA est un polymère linéaire de ribonucléotides unis par des liaisons phosphodiester (*Figure 2.5A*). Les bases y sont l'adénine (A), la guanine (G), la cytosine (C) et l'uracile (U) (*Figure 2.1B et C*). Elle se distingue donc d'une chaîne de DNA par l'ose, qui est le ribose et non pas le désoxyribose, et par l'une des bases pyrimidiques, qui est l'uracile et non pas la thymine. Contrairement au DNA, une molécule de RNA procaryote ou eucaryote est habituellement sous la forme simple brin dont des segments, éventuellement étendus, peuvent présenter des appariements de bases G-C et A-U. Il semble que le monde à DNA actuel ait été précédé par un monde à RNA, ce dernier se présentant alors comme le détenteur à la fois d'une information génétique et de propriétés fonctionnelles, catalytiques entre autres.

Chez certains Virus, le RNA constitue le matériel génétique ; il y assure sa réplication en dirigeant lui-même une RNA polymérase. Dans toutes les cellules procaryotes ou eucaryotes actuelles, les RNA constituent le transcriptome ; ils y sont synthétisés par des RNA polymérases, enzymes qui transcrivent les instructions données par une matrice de DNA ; les RNA sont donc la copie d'une région du DNA avec la correspondance des bases A → U, T → A, G → C et C → G. Les cellules contiennent trois types de RNA : les RNA messagers (mRNA), le RNA ribosomique (rRNA) et les RNA de transfert (tRNA).

Les mRNA (*Figure 2.5B*) constituent les matrices à partir desquelles sont traduites les protéines ; chez *E. Coli*, un mRNA, dont la longueur moyenne est d'environ 1,2 kilobase, peut être produit par un gène ou un groupe de gènes, tandis que chez les Eucaryotes, à chaque mRNA correspond le plus souvent un gène distinct. Étant donné que les protéines sont construites à partir de 20 aminoacides mais qu'il n'y a que 4 bases, un groupe de 3 bases, appelé codon, est nécessaire pour coder pour un aminoacide. Les mRNA se présentent donc comme une succession de codons mais ils contiennent aussi des signaux de départ et des signaux stop pour la synthèse des protéines.

Les rRNA sont les constituants essentiels des ribosomes où ils ont un rôle structural et une fonction catalytique lors de la synthèse des protéines. Chez *E. Coli*, il y a trois types de rRNA dénommés, en raison de leur coefficient de sédimentation, 23S, 16S et 5S. Chez les Eucaryotes, les rRNA ont des masses plus importantes et leurs coefficients de sédimentation sont de 28S, 18S et 5S. Les rRNA présentent une structure secondaire et une structure tertiaire où apparaissent de nombreuses régions courtes en duplex résultant d'appariements de bases (*Figure 2.5C*).



Figure 2.5

(A)

RNA

O 3' O ⊖ P O 5' O Base O 3' OH O ⊖ P O 5' O Base O 3' OH O ⊖ P O

(B)

5' — GCGGCGA...........CAUUUU — 3' mRNA

3' — CGCCGCT...........GTAAAA — 5' Brin matriciel de DNA

5' — GCGGCGA...........CATTTT — 3' Brin codant de DNA

Complémentarité entre le mRNA et le DNA

(C)

Schéma de reploiement du RNA ribosomique

700 1100 800 1200 1000 600 900 1300 5' 1400 3' 5' 300 1542 3' 100 200

rRNA 16S rRNA 5S

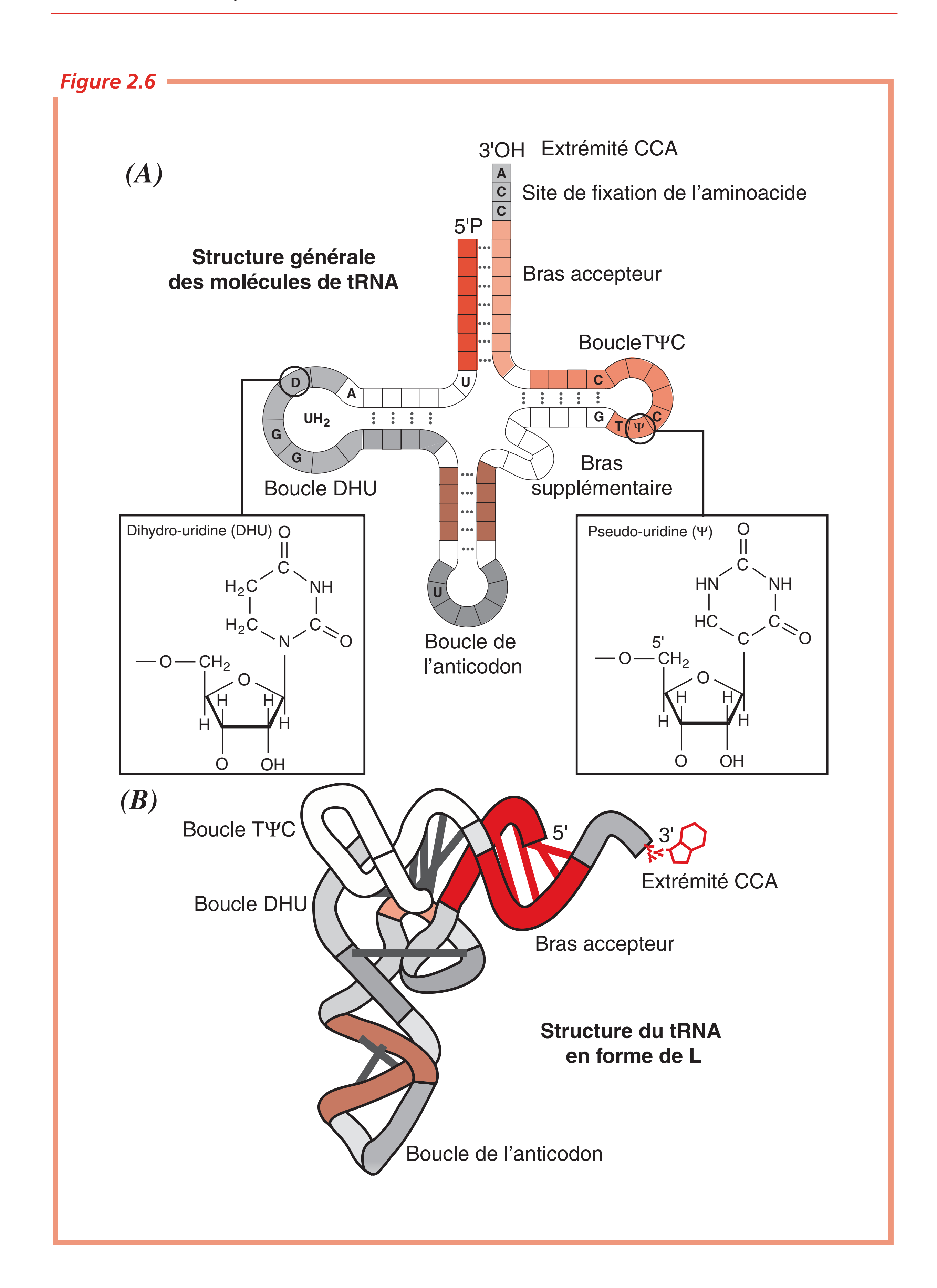
Les tRNA transfèrent des aminoacides activés vers les ribosomes où sont formées les liaisons peptidiques grâce auxquelles sont élaborées les protéines. Ils jouent le rôle de molécules adaptatrices entre le mRNA et le site de synthèse des protéines. Il y a au moins un type de tRNA pour chacun des 20 aminoacides et le transfert s'effectue selon une séquence imposée par le mRNA.

Les tRNA sont des petits acides ribonucléiques constitués de 73 à 93 ribonucléotides seulement. Leur extrémité 5' est phosphorylée, habituellement pG, tandis que leur extrémité 3' présente un groupe OH libre. Ils contiennent de 10 à 15 % de nucléosides rares : dihydro-uridine, N_1-méthylguanosine, N_2-diméthylguanosine, inosine, pseudo-uridine, entre beaucoup d'autres ; ces nucléosides sont caractérisés par la présence de bases inhabituelles, souvent méthylées, qui apparaissent après la synthèse de la chaîne polypeptidique à la suite de l'action de divers enzymes. Les tRNA diffèrent par leurs séquences nucléotidiques.

Tous les tRNA sont susceptibles d'adopter une structure secondaire, dite en feuille de trèfle (*Figure 2.6A*), caractérisée par quatre zones d'appariement entre bases complémentaires et trois boucles : la boucle TΨC (de ribothymine-pseudouracile-cytosine), la boucle DHU (contenant plusieurs résidus dihydro-uracile) et la boucle de l'anticodon qui porte un site spécifique essentiel constitué par une séquence de trois bases, appelée anticodon ; ce dernier reconnaît une séquence complémentaire de trois bases, appelée codon, sur le mRNA. Tous les tRNA contiennent, à l'extrémité 3' de leur chaîne dite bras accepteur, un site d'attachement pour un aminoacide constitué par la même séquence trinucléotidique terminale *p*C*p*C*p*A en simple brin ; le carboxyle de l'aminoacide est estérifié par l'hydroxyle en 3' ou 2' du ribose adénylique terminal grâce à une réaction catalysée par une aminoacyl-tRNA synthétase spécifique.

Tous les tRNA présentent aussi une conformation tridimensionnelle native en forme de L (*Figure 2.6B*). Une telle conformation est due à la formation de deux segments perpendiculaires en double hélice d'environ dix paires de bases chacun et à la présence d'interactions par liaisons hydrogène entre les bases des régions non hélicoïdales. L'extrémité *p*C*p*C*p*A contenant le site d'attachement de l'aminoacide est située à l'extrémité souple du L tandis que la boucle de l'anticodon est à l'autre extrémité, ce qui expose les trois bases de l'anticodon et les rend accessibles aux trois bases complémentaires du codon. Ainsi, l'architecture de la molécule de tRNA est adaptée à la fonction d'adaptateur de ce dernier : l'extrémité flexible liée à un aminoacide activé peut se positionner correctement pour participer à la formation d'une liaison peptidique tandis que l'anticodon est disponible pour reconnaître un codon approprié du mRNA.

Figure 2.6


(A)
3'OH
Extrémité CCA
Site de fixation de l'aminoacide
5'P
Structure générale
des molécules de tRNA
Bras accepteur
BoucleTΨC
UH2
Boucle DHU
Bras
supplémentaire
Dihydro-uridine (DHU)
Pseudo-uridine (Ψ)
Boucle de
l'anticodon
(B)
Boucle TΨC
Boucle DHU
5'
3'
Extrémité CCA
Bras accepteur
Structure du tRNA
en forme de L
Boucle de l'anticodon

Chapitre 3

Glucides et glycoconjugués

On regroupe sous le nom de glucides certaines substances naturelles qui, au moins pour celles qui sont hydrosolubles, ont une saveur douce ou sucrée. On les appelle aussi hydrates de carbone (en anglais, *carbohydrates*) en raison de leur formule élémentaire $C_n(H_2O)_n$, sucres ou encore saccharides, par adoption du terme anglais.

On distingue les glucides, avec les oses simples (monosaccharides) tels que le glucose ou le galactose, les oligosides (oligosaccharides) tels que le maltose ou le cellobiose, les polyosides (polysaccharides) tels que l'amidon, le glycogène ou la cellulose, et les glycoconjugués avec les protéoglycanes, les glycoprotéines et les glycolipides. La glycosylation est en effet un événement post-traductionnel ubiquitaire et de nombreux glycoconjugués sont présents dans les organismes vivants. En effet, nombre de protéines contiennent des chaînes osidiques dénommées glycanes qui diffèrent par leur mode de liaison à la chaîne polypeptidique et présentent une grande hétérogénéité directement en relation avec leur fonction biologique. De plus, les glycanes se présentent sous la forme d'une population de variants attachés à une même chaîne peptidique, ou glycoformes tissulaires. On distingue deux types principaux de glycanes, les glycosaminoglycanes, rencontrés dans les protéoglycanes et les *O*- ou *N*-glycanes des glycoprotéines. Des glycanes se trouvent aussi associés à certains lipides pour former des glycolipides.

Les glucides sont les biomolécules les plus abondantes de la planète. Ils jouent au sein des êtres vivants nombre de rôles très divers, tant structuraux que métaboliques. Les glycoconjugués participent, eux, essentiellement aux processus de reconnaissance et de communication intercellulaire.

STRUCTURE LINÉAIRE DES OSES

L'analyse élémentaire donne pour formule des oses $C_n(H_2O)_n$, avec n compris entre 3 et 6, d'où leur nom d'hydrates de carbone. Selon le nombre d'atomes de carbone, on distingue les trioses, où n = 3, les tétroses, où n = 4, les pentoses, où n = 5 et les hexoses, où n = 6. L'analyse fonctionnelle met en évidence la présence dans la molécule d'un groupe carbonyle aldéhydique qui caractérise les aldoses (des aldotrioses aux aldohexoses) ou d'un groupe carbonyle cétonique subterminal qui définit les cétoses (des cétotrioses aux cétohexoses) ; de plus, elle montre la présence de (n – 1) groupes hydroxyle fixés sur une chaîne carbonée linéaire. Par convention, les atomes de carbone des aldoses et des cétoses sont numérotés d'une extrémité à l'autre de la chaîne carbonée de telle façon que le carbone du groupe carbonyle soit affecté du plus petit numéro possible : 1 pour les aldoses, 2 pour les cétoses (*Figure 3.1A*).

Les liaisons carbone-carbone font entre elles des angles de 109° (angle de valence du carbone tétraédrique) et la rotation de chaque atome de carbone autour de chaque liaison est libre. De nombreuses conformations étant, *a priori*, possibles, on représente les oses selon une convention dite projection de Fischer, universellement adoptée ; on dispose tous les atomes de carbone sur une ligne convexe, contenue dans un plan vertical et vue par sa convexité, et les groupes hydroxyle secondaire de part et d'autre de ce plan. Les travaux d'Emil Fischer ont permis de connaître les dispositions relatives des groupes hydroxyle des oses, et en particulier de deux parmi les plus importants, le glucose, un aldohexose, et le fructose, un cétohexose (*Figure 3.1A*).

CENTRES D'ASYMÉTRIE DES OSES : LE GLYCÉRALDÉHYDE

Le glycéraldéhyde

La projection de Fischer fait clairement apparaître les carbones asymétriques présents dans la structure des oses. Ainsi l'aldose le plus simple, le glycéraldéhyde, contient un centre de chiralité, l'atome de carbone central. Il a donc deux isomères optiques, ou énantiomères, dont les structures tridimensionnelles sont les images l'une de l'autre dans un miroir (*Figure 3.1B*) et dont le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D$ est de + 13,5° pour l'une et de – 13,5° pour l'autre. Il a tout d'abord été décidé que, par convention, celui qui déviait le plan de la lumière polarisée vers la droite serait désigné sous l'appellation d'isomère D (de dextrogyre), l'autre sous celle d'isomère L (de lévogyre). Par la suite, la détermination de la configuration absolue des isomères optiques du glycéraldéhyde a pu être établie ; il s'est avéré que dans la projection de Fischer, où les liaisons verticales vont vers l'arrière (flèches pointillées) et les liaisons horizontales vers l'avant (flèches pleines), c'est l'isomère D du glycéraldéhyde qui présente son groupe hydroxyle secondaire à la droite de l'observateur (*Figure 3.1B*). On peut donc considérer que les préfixes D et L désignent la configuration absolue de l'atome de carbone C-2 du glycéraldéhyde, composé qui sert de référence pour la configuration absolue des oses, mais aussi de celle d'autres biomolécules telles que les aminoacides (*Figure 3.1C* et (p. 8)).



(A)

1 CHO — $[C(H, OH)]_n$ — 2 — n CH_2OH

1 CH_2OH — 2 CO — $[C(H, OH)]_n$ — 3 — n CH_2OH

Aldoses

Cétoses

Formule linéaire

Glucose: 1 CHO, 2 HCOH, 3 HOCH, 4 HCOH, 5 HCOH, 6 CH_2OH

Fructose: 1 CH_2OH, 2 C = O, 3 HOCH, 4 HCOH, 5 HCOH, 6 CH_2OH

Projection de Fischer

(B)

Miroir

L-Glycéraldéhyde

D-Glycéraldéhyde

Modèle moléculaire

Miroir

L-Glycéraldéhyde: 1 CHO, HO ▶ 2 C ◀ H, 3 CH_2OH, $[\alpha]_D - 13,5$

D-Glycéraldéhyde: 1 CHO, H ▶ 2 C ◀ OH, 3 CH_2OH, $[\alpha]_D + 13,5$

Projection de Fischer

(C)

Groupe carboxyle

Carbone α

Groupe amine

Carbone β

Groupe méthyle (chaîne latérale-R)

Miroir

L-Alanine

D-Alanine

Modèle moléculaire

Miroir

L-α-Aminoacide: COO^{-}, H_3N^{+} ▶ C α ◀ H, R

D-α-Aminoacide: COO^{-}, H ▶ C α ◀ NH_3^{+}, R

Projection de Fischer

Des trioses aux hexoses

Une molécule avec *n* centres de chiralité peut avoir 2*n* stéréoisomères ; les aldotétroses, avec 2 atomes de carbone asymétriques, présentent 2^2, soit 4 stéréoisomères, les aldopentoses, avec 3 atomes de carbone asymétriques, 8, et les aldohexoses, avec 4 atomes de carbone asymétriques, 16. Ces stéréoisomères sont répartis en deux groupes selon la configuration du centre de chiralité le plus éloigné du groupe carbonyle ; ceux dont la configuration de l'avant-dernier atome de carbone est identique à celle du C-2 du D-glycéraldéhyde appartiennent à la série D, les autres à la série L. La configuration absolue d'un ose de la série D et celle du même ose de la série L sont les images l'une de l'autre dans un miroir. Ces considérations s'appliquent à l'ensemble des oses.

Ainsi, pour les deux aldotétroses, l'érythrose et le thréose, du nom desquels dérive la nomenclature érythro-thréo, on distingue les deux diastéréoisomères, le D-érythrose et le D-thréose, d'une part (*Figure 3.2A*), et les deux autres diastéréoisomères, le L-érythrose et le L-thréose, d'autre part, non représentés ici. Comme le montre la *Figure 3.2B*, les structures du D-thréose et du L-thréose, prises ici comme exemple, sont les images l'une de l'autre dans un miroir.

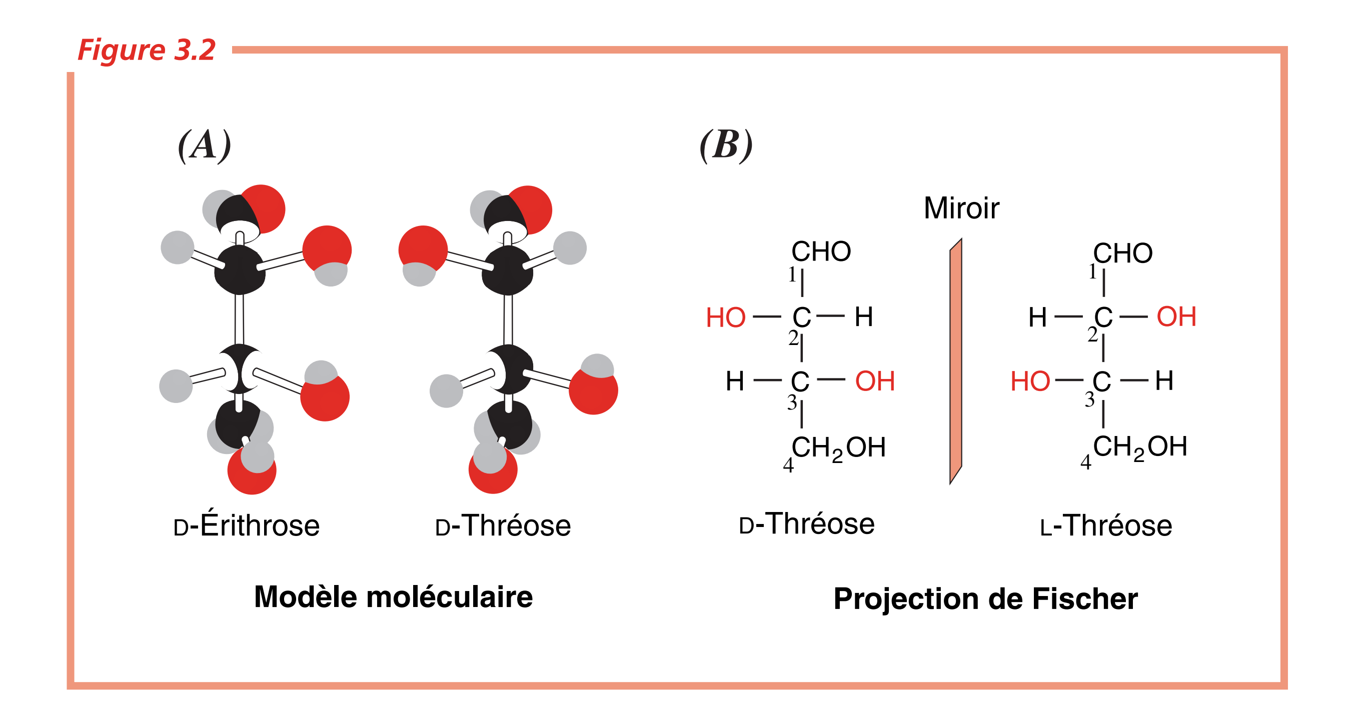
FILIATION DES OSES

La *Figure 3.3* présente les D-aldoses et les D-cétoses et indique leurs relations stéréochimiques. On passe du D-glycéraldéhyde ou de la dihydroxyacétone aux tétroses puis aux pentoses et enfin aux hexoses en additionnant, à chaque étape, juste en dessous de l'atome de carbone du groupe carbonyle, un atome de carbone tétraédrique (ombré en rouge) porteur d'un groupe hydroxyle et d'un atome d'hydrogène. Ce carbone est donc un nouveau centre de chiralité, avec deux orientations relatives possibles des substituants, ce qui crée un nouveau couple de stéréoisomères. Deux oses qui ne diffèrent que par la configuration d'un seul atome de carbone sont dits épimères. Ainsi, le glucose et le mannose sont des épimères car leurs configurations ne diffèrent qu'au niveau de leur C-2 ; il en est de même pour le glucose et le galactose où seule la configuration au niveau de leur C-4 est inversée. On passe du nom d'un aldose à celui du cétose correspondant en ajoutant les deux lettres ul avant la désinence ose ; ainsi, à l'érythrose correspond l'érythrulose. Dans la *Figure 3.3*, les noms des oses les plus habituellement rencontrés dans la nature sont encadrés.

La plupart des oses présents chez les êtres vivants appartiennent à la série D mais quelques-uns, tels que l'arabinose, et certains 6-désoxyhexoses constituants des glycoconjugués, tels que le fucose (6-désoxy-L-galactose) et le rhamnose (6-désoxy-L-mannose), appartiennent à la série L.

Le glucose lui-même est très répandu. Les autres oses sont habituellement rencontrés comme constituants des oligosides et des polyosides.

Figure 3.2

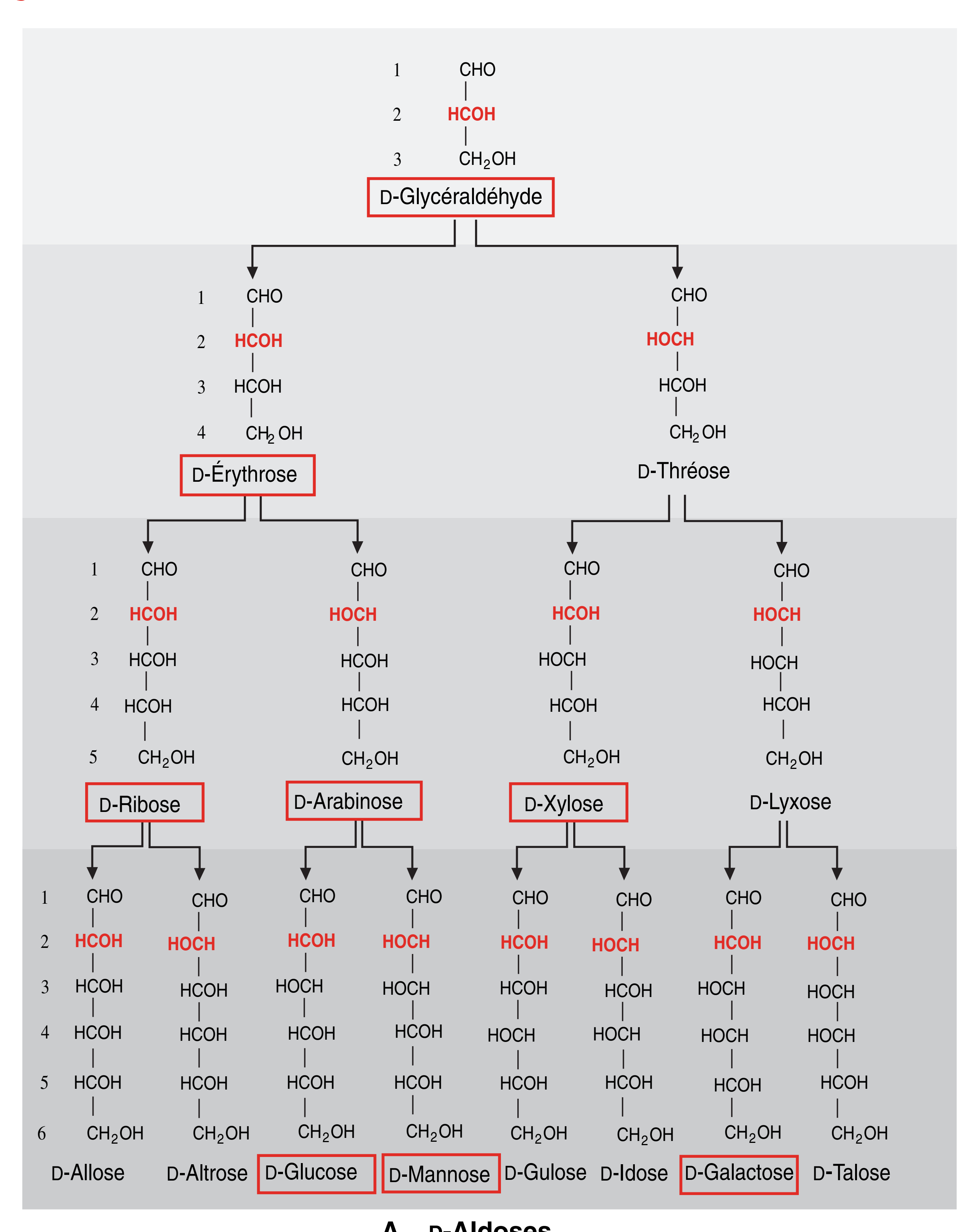


Lors des premières études du saccharose (p. 68), le sucre de table extrait de la canne à sucre ou de la betterave, l'hydrolyse de ce composé a montré qu'il était constitué d'une molécule d'un ose dextrogyre, qui s'est révélé être le glucose, et d'un ose lévogyre, identifié comme étant le fructose. Il s'en est suivi qu'initialement, ces deux oses ont été appelés dextrose et lévulose, respectivement ; ces noms sont encore parfois utilisés.

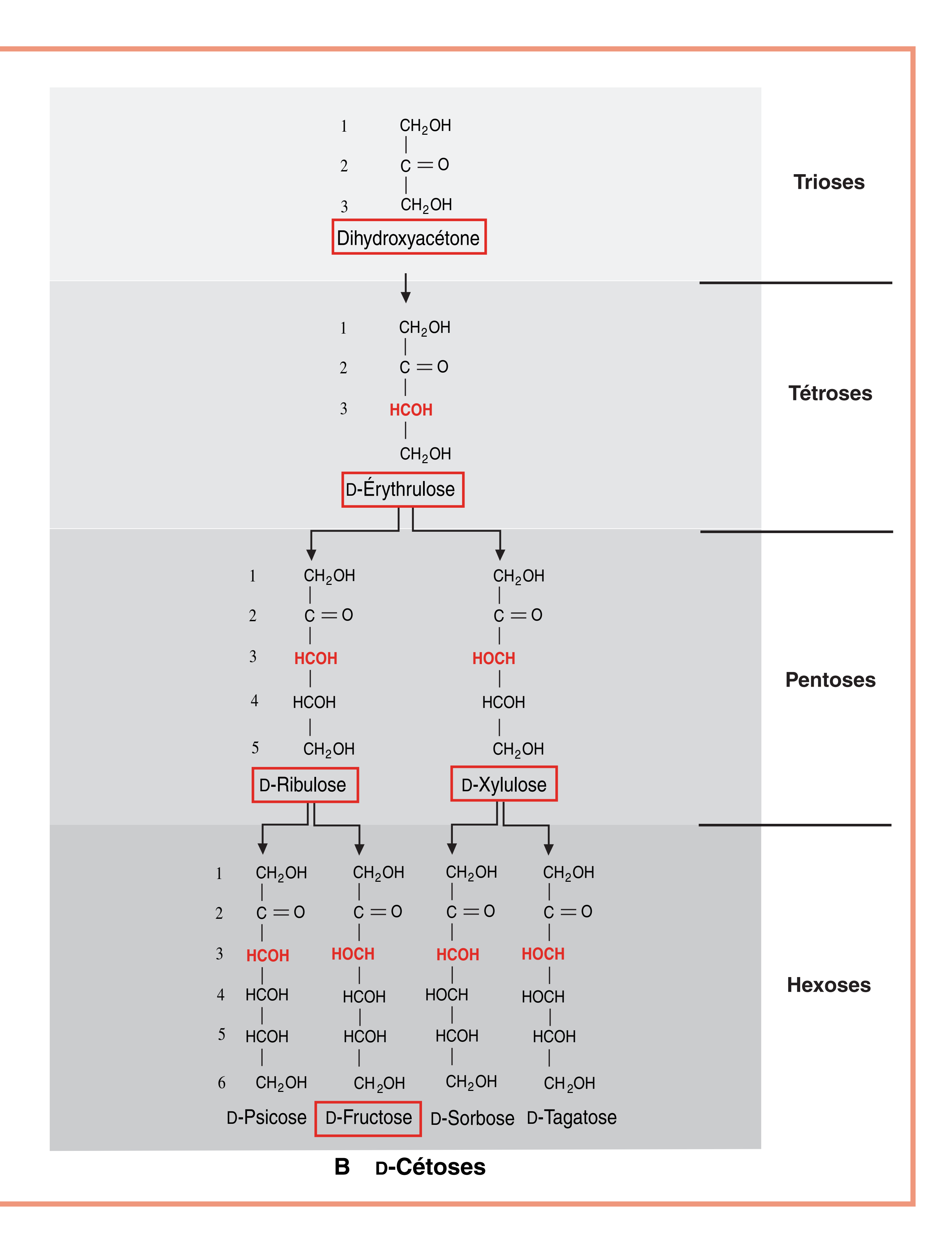
Le miel, vraisemblablement la première substance sucrée à avoir été consommée par l'Homme, est une suspension sursaturée de microcristaux d'hydrate de glucose (31 %) et d'hydrate de fructose (38 %), ce qui lui permet d'être conservé pendant de longues périodes à température ambiante. Il résulte de la transformation du saccharose du nectar des fleurs par les abeilles qui mettent en œuvre deux processus. Tout d'abord, elles réduisent la teneur en eau du nectar qui passe de 30 à 60 % à 15 à 20 %. Puis, grâce à l'action d'une invertase, elles hydrolysent le saccharose du nectar en glucose et fructose.

Une propriété chimique qui a joué un rôle important dans la chimie analytique des oses sous forme linéaire est le pouvoir réducteur du groupe carbonyle de ces derniers. Elle est à la base de la réaction de Fehling où sont réduits des ions cuivriques Cu^{2+}. Elle se retrouve dans les polyosides où subsiste un groupe carbonyle libre non engagé dans une liaison osidique (p. 66).

Figure 3.3



A D-Aldoses



Trioses
1 CH_2OH
2 C = O
3 CH_2OH
Dihydroxyacétone
Tétroses
1 CH_2OH
2 C = O
3 HCOH
CH_2OH
D-Érythrulose
Pentoses
1 CH_2OH CH_2OH
2 C = O C = O
3 HCOH HOCH
4 HCOH HCOH
5 CH_2OH CH_2OH
D-Ribulose
D-Xylulose
Hexoses
1 CH_2OH CH_2OH CH_2OH CH_2OH
2 C = O C = O C = O C = O
3 HCOH HOCH HCOH HOCH
4 HCOH HCOH HOCH HOCH
5 HCOH HCOH HCOH HCOH
6 CH_2OH CH_2OH CH_2OH CH_2OH
D-Psicose
D-Fructose
D-Sorbose
D-Tagatose

B D-Cétoses

STRUCTURE CYCLIQUE DES OSES

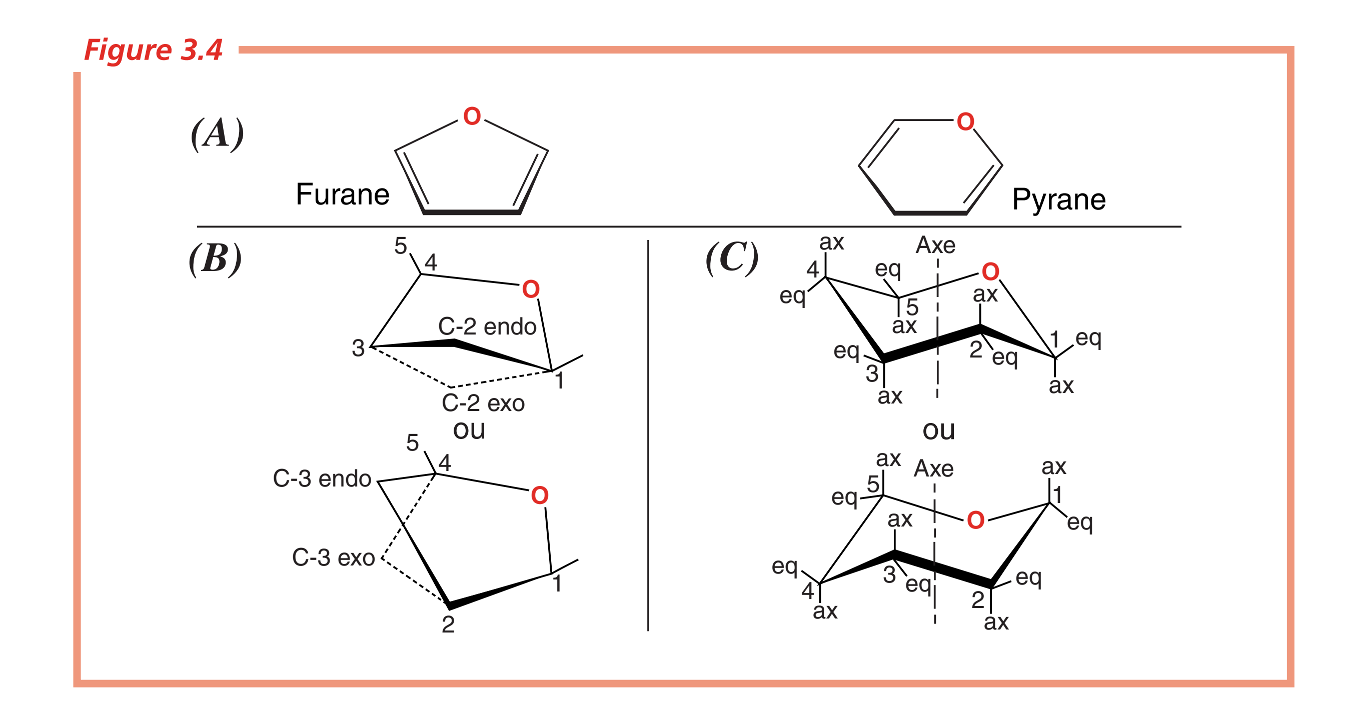
Haworth a découvert qu'en solution aqueuse, les oses à cinq atomes de carbone ou plus adoptent préférentiellement une structure cyclique qui résulte d'une hémiacétalisation interne entre le groupe carbonyle aldéhydique ou cétonique et l'un des groupes hydroxyle. L'hétérocycle formé est constitué de cinq ou de six atomes, dont un atome d'oxygène, et, bien qu'il ne contienne pas de doubles liaisons conjuguées, il évoque le furane ou le pyrane, respectivement ; les oses sous forme cyclique sont alors dénommés furanose ou pyranose (*Figure 3.4A*). Le cycle furanose ne peut pas être rigoureusement plan : alors que quatre atomes sont contenus dans un plan, le cinquième est situé hors de ce dernier et la conformation est dite enveloppe (*Figure 3.4B*). De même, le cycle pyranose adopte préférentiellement une conformation chaise où les groupes hydroxyle et les atomes d'hydrogène qui lui sont liés s'orientent de façon axiale ou équatoriale par rapport au plan équatorial du cycle (*Figure 3.4C*).

La structure cyclique des oses est représentée selon la projection de Haworth où le cycle est vu en perspective, les liaisons proches de l'observateur étant en gras, et où les H et les groupes -OH et -CH_2OH liés aux atomes de carbone du cycle sont représentés au-dessous ou au-dessus du plan d'ensemble de ce dernier. Il y a une correspondance directe entre l'orientation des groupes hydroxyle dans les projections de Fischer et de Haworth : ceux qui sont représentés à droite dans une projection de Fischer sont au-dessous du cycle dans une projection de Haworth. Intrinsèquement, la conformation du cycle pyranose est plus stable que celle du cycle furanose et, dans la plupart des cas, la forme pyranose prédomine en solution. L'atome de carbone le plus oxydé d'un ose cyclisé, le seul qui soit lié à deux atomes d'oxygène avec lesquels il partage quatre électrons, est dit carbone anomérique ; il constitue un nouveau centre de chiralité et il apparaît alors deux nouveaux isomères, appelés anomères α et β selon que, dans la série D, le groupe hydroxyle se situe au-dessous ou au-dessus du plan d'ensemble du cycle, respectivement. En solution aqueuse, les anomères α et β s'interconvertissent par un phénomène appelé mutarotation pour atteindre un équilibre qui dépend de chaque ose.

Aldoses

Le D-ribose en solution aqueuse se cyclise en α-D-ribofuranose, β-D-ribofuranose, α-D-ribopyranose et β-D-ribopyranose (*Figure 3.5*), les formes pyranose étant trois fois plus abondantes que les formes furanose ; la forme linéaire ne représente qu'une très faible fraction des molécules. Le D-ribose est très répandu chez les êtres vivants ; dans le RNA, il se présente exclusivement sous la forme de β-D-ribofuranose avec la conformation C-3' endo, tandis que, dans le DNA, son dérivé, le β-D-2-désoxyribofuranose, a la conformation C-2' endo (p. 44).

Le D-glucose en solution aqueuse est presque exclusivement sous la forme glucopyranose (*Figure 3.6*) ; le glucofuranose n'existe pratiquement pas. L'équilibre qui s'établit à 36 % d'anomère α et 64 % d'anomère β s'explique par la plus grande stabilité de ce dernier où tous les groupes hydroxyle sont équatoriaux et où, par conséquent, les forces de répulsion entre les groupes hydroxyle sont les plus faibles. Le D-glucose est l'une des sources d'énergie essentielles pour les êtres vivants ; l'α-D-glucose polymérisé constitue l'amylose, l'amylopectine et l'amidon des végétaux et le glycogène des animaux (p. 68). Le



β-D-glucose polymérisé joue aussi un rôle structural qualitativement et quantitativement très important en tant que constituant de la cellulose des végétaux (p. 70).

Pour le D-mannose, où le groupe hydroxyle en C-2 est axial (*Figure 3.7A*), la forme pyranose est elle aussi presque exclusive, mais l'anomère α prédomine. Le D-mannose est présent dans certains polyosides végétaux et dans de nombre de glycoprotéines animales.

Dans le D-galactose, le groupe hydroxyle en C-4 est axial (*Figure 3.7B*). Le β-D-galactose lié au β-D-glucose forme le lactose, qui est le sucre du lait (p. 66).

Cétoses

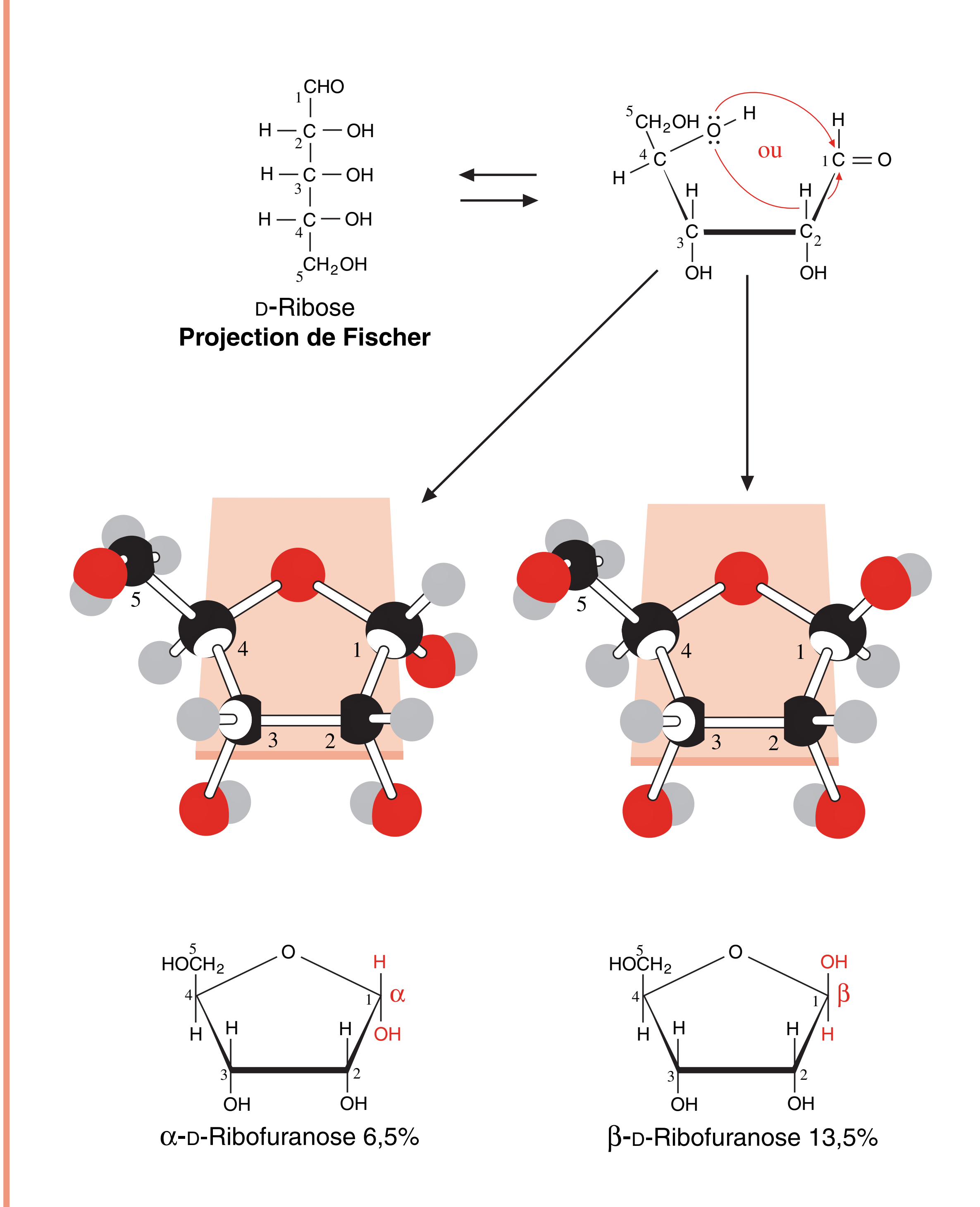
Comme les aldopentoses, les cétopentoses existent presque exclusivement sous la forme cyclique. Cependant, dans ce cas, seule la forme furanose est possible. Un exemple en est l'α-D-ribulose (*Figure 3.7C*) qui est l'un des principaux intermédiaires dans la fixation du CO_2 lors de la photosynthèse.

Pour le D-fructose en solution aqueuse (*Figure 3.7D*), un équilibre s'établit entre les quatre formes différentes possibles, mais avec presque un tiers de β-D-fructofuranose et deux tiers de β-D-fructopyranose. En revanche, c'est le β-D-fructofuranose qui, avec l'α-D-glucose, constitue le saccharose (le *sucre* en langage courant) (p. 66), glucide d'origine végétale important dans l'alimentation humaine.

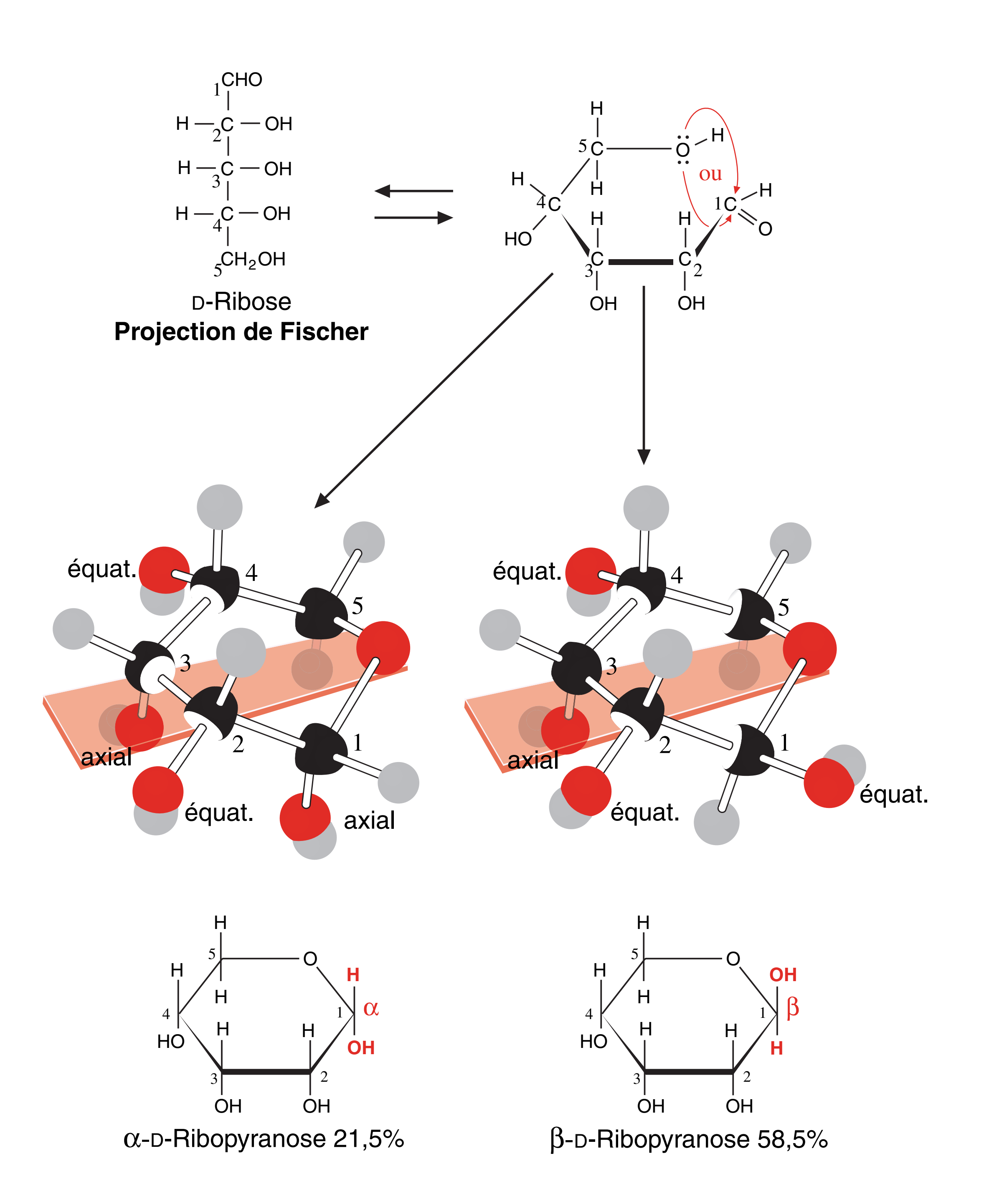
Heptoses et octoses

Il existe dans la nature des oses qui possèdent sept ou huit atomes de carbone, dénommés heptoses et octoses, respectivement. La plupart d'entre eux sont de faible importance biologique, à l'exception du sédoheptulose (*Figure 3.7E*) qui joue un rôle essentiel dans la fixation du CO_2 lors de la photosynthèse.

Figure 3.5

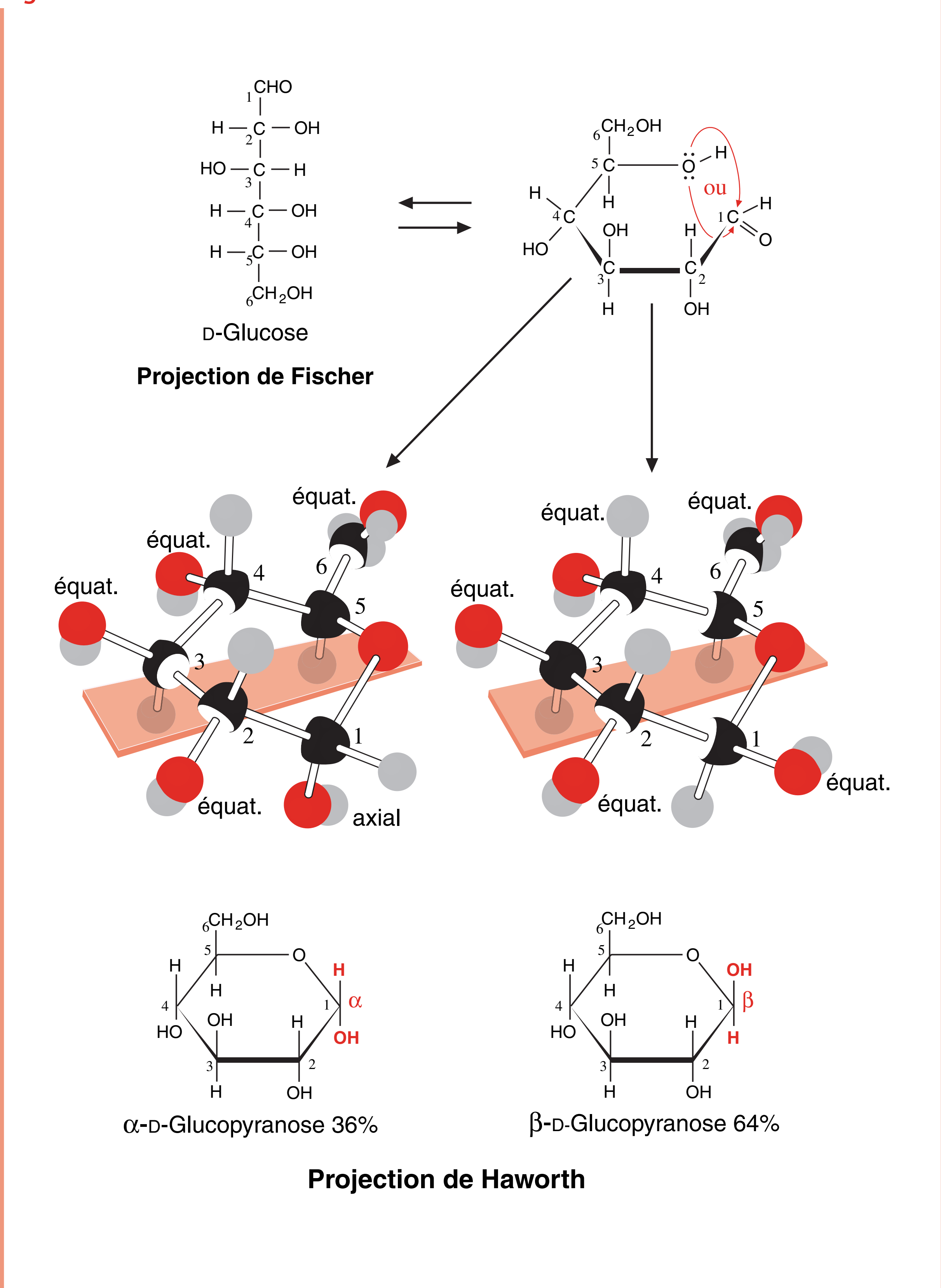


Projection de Haworth



Projection de Haworth

Figure 3.6



CHO
H — C — OH
HO — C — H
H — C — OH
H — C — OH
CH₂OH
D-Glucose
Projection de Fischer
CH₂OH
ou
équat.
équat.
équat.
équat.
axial
équat.
équat.
équat.
équat.
équat.
α
β
α-D-Glucopyranose 36%
β-D-Glucopyranose 64%
Projection de Haworth



Figure 3.7
(A)
6
4
5
3
2
1
(B)
6
4
5
3
2
1
(C)
β-D-Mannopyranose
(E)
β-D-Galactopyranose
H
O
1CH2OH
5
2
H
H
H
OH
4
3
OH
OH
α-D-Ribulofuranose
7CH2OH
6
H
O
1CH2OH
H
5
2
H
HO
OH
OH
4
3
OH
H
α-D-Sédoheptulopyranose
(D)
6
5
2
1
4
3
5
6
4
3
2
1
β-D-Fructofuranose ≃ 20%
β-D-Fructopyranose ≃ 80%

DÉRIVÉS DES OSES

Dans les organismes vivants, il y a, outre les oses décrits ci-dessus, des constituants biologiquement importants dérivés de ces derniers.

Lors de la biosynthèse et du métabolisme des glucides, la plupart des systèmes enzymatiques reconnaissent, non pas les oses eux-mêmes, mais leurs dérivés phosphorylés : par exemple, les trioses phosphate (D-glycéraldéhyde 3-phosphate et dihydroxyacétone phosphate), le glucose 6-phosphate, le glucose 1-phosphate (*Figure 3.8A*).

Les aldoses sont réducteurs et l'oxydation de leur groupe carbonyle aldéhydique en un groupe carboxyle conduit aux acides aldoniques ; ainsi, au D-glucose correspond le D-gluconate susceptible de se lactoniser en D-glucono-δ-lactone (*Figure 3.8B*). L'oxydation du groupe hydroxyle en C-6 donne l'acide uronique correspondant ; ainsi, au D-glucose correspond le D-glycuronate (*Figure 3.8B*).

La réduction du groupe carbonyle aldéhydique des aldoses en un groupe hydroxyle conduit aux alditols ; ainsi, au D-glucose correspond le D-glucitol, souvent appelé sorbitol (*Figure 3.8C*).

Un groupe hydroxyle peut être remplacé par un atome d'hydrogène, comme dans le L-fucose et le L-rhamnose qui deviennent des désoxyoses (*Figure 3.8D*). Il peut aussi être remplacé par un groupe amine pour donner, par exemple, la glucosamine ou la galactosamine, acétylées ou non (*Figure 3.8E*). Ces oses aminés peuvent subir des substitutions supplémentaires et conduire, entre autres, à l'acide muramique ou à l'acide neuraminique dont les dérivés *N*-acétylés ou *N*-glycolylés sont appelés acides sialiques (*Figure 3.8F*). Tous ces composés sont d'importants constituants de nombreux glycoconjugués naturels.

Figure 3.8

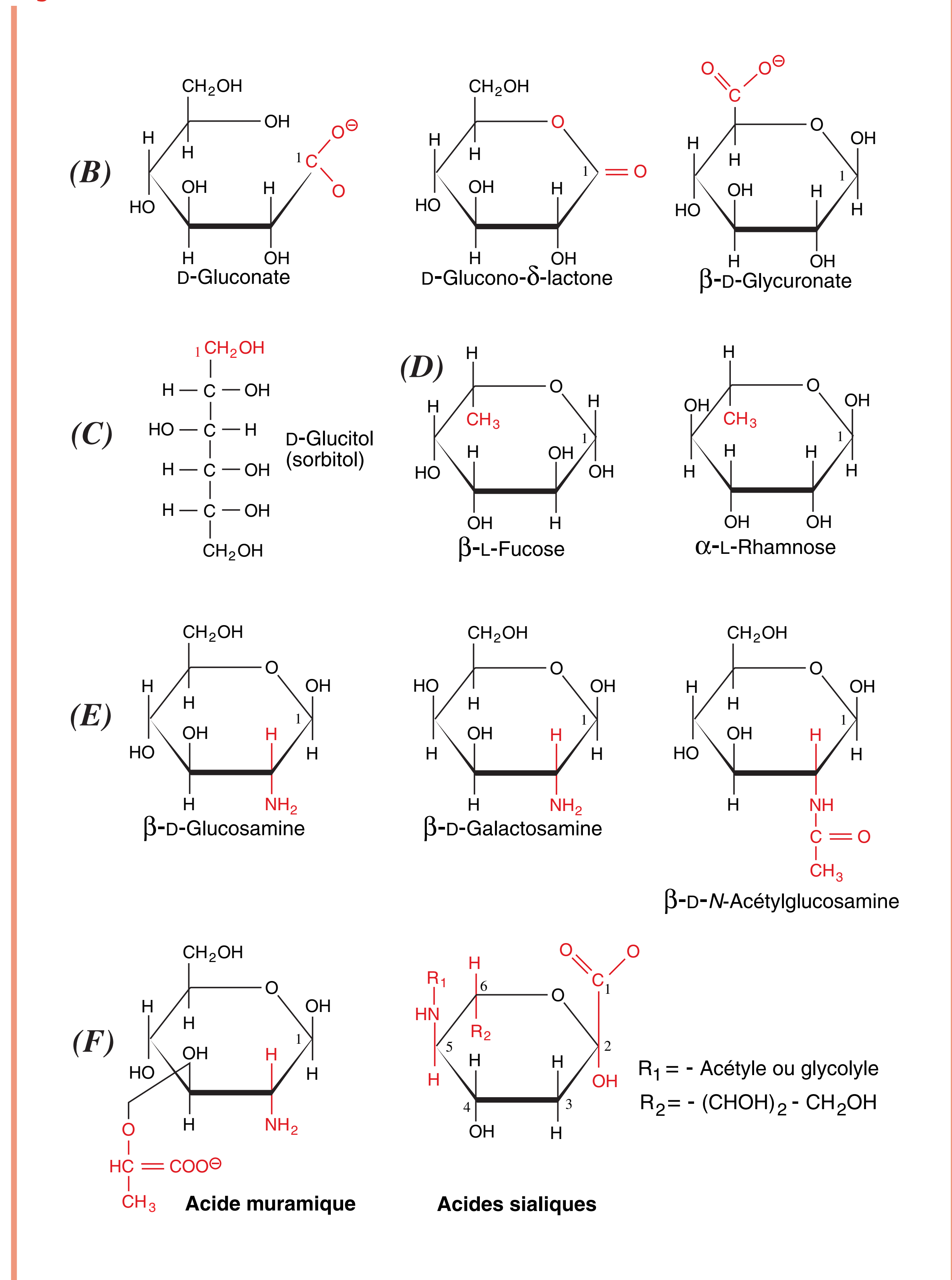
(A)

D-Glycéraldéhyde 3-phosphate

α-D-Glucose 6-phosphate

α-D-Glucose 1-phosphate

Figure 3.8


(B)
D-Gluconate
D-Glucono-δ-lactone
β-D-Glycuronate
(C)
D-Glucitol
(sorbitol)
(D)
β-L-Fucose
α-L-Rhamnose
(E)
β-D-Glucosamine
β-D-Galactosamine
β-D-N-Acétylglucosamine
(F)
Acide muramique
Acides sialiques
R1 = - Acétyle ou glycolyle
R2 = - (CHOH)2 - CH2OH

LA LIAISON GLYCOSIDIQUE

Une liaison glycosidique implique la condensation du groupe hydroxyle porté par l'atome de carbone anomérique avec le groupe hydroxyle d'un alcool ou d'un hémiacétal, formant une liaison *O*-glycosidique, ou avec une amine, formant alors une liaison *N*-glycosidique.

Dans certains osides, les oses sont unis les uns aux autres par une liaison *O*-glycosidique formée entre l'atome de carbone anomérique de l'un d'eux et l'atome d'oxygène d'un groupe hydroxyle de l'ose adjacent ; de tels osides présentent une extrémité réductrice. Ainsi, dans le maltose, deux molécules de D-glucopyranose sont unies par une liaison écrite ($\alpha 1 \rightarrow 4$) ce qui indique que la configuration du carbone anomérique du premier ose est de type α et que la liaison osidique unit le carbone C-1 du premier ose au carbone C-4 du second (*Figure 3.9A*) ; cette structure est retrouvée dans l'amylose, l'amylopectine, l'amidon et le glycogène (p. 68). Dans le cellobiose, deux molécules de D-glucopyranose sont unies par une liaison écrite de même ($\beta 1 \rightarrow 4$), parce que dans cette biomolécule la configuration du carbone anomérique du premier ose est de type β (*Figure 3.9B*) ; cette structure est retrouvée dans la cellulose (p. 70) et une structure semblable constitue la chitine (p. 70). Dans le lactose (*Figure 3.9C*), une molécule de D-galactopyranose est unie à une molécule de D-glucopyranose par une liaison écrite ($\beta 1 \rightarrow 4$).

Dans d'autres osides, les oses sont unis les uns aux autres par une liaison *O*-glycosidique formée entre les hydroxyles portés par les deux carbones anomériques ; de tels osides n'ont pas d'extrémité réductrice et sont alors appelés glycosides. Ainsi, dans le saccharose, une molécule de β-D-fructofuranose est unie à une molécule d'α-D-glucopyranose par une liaison osidique ($\beta 2 \leftrightarrow 1\alpha$) (*Figure 3.9D*).

Dans les glycoprotéines, les oses sont attachés, soit à l'atome d'oxygène d'un résidu sérine ou thréonine (liaison *O*-glycosidique), soit à l'atome d'azote de l'amide d'un résidu asparagine (liaison *N*-glycosidique) (p. 74).

Dans les nucléosides (p. 38), les nucléotides (p. 38), le RNA (p. 46) et le DNA (p. 42), l'atome de carbone anomérique, pratiquement toujours dans la configuration β, est uni à l'amine secondaire d'une base purique ou pyrimidique par une liaison *N*-glycosidique.

Figure 3.9

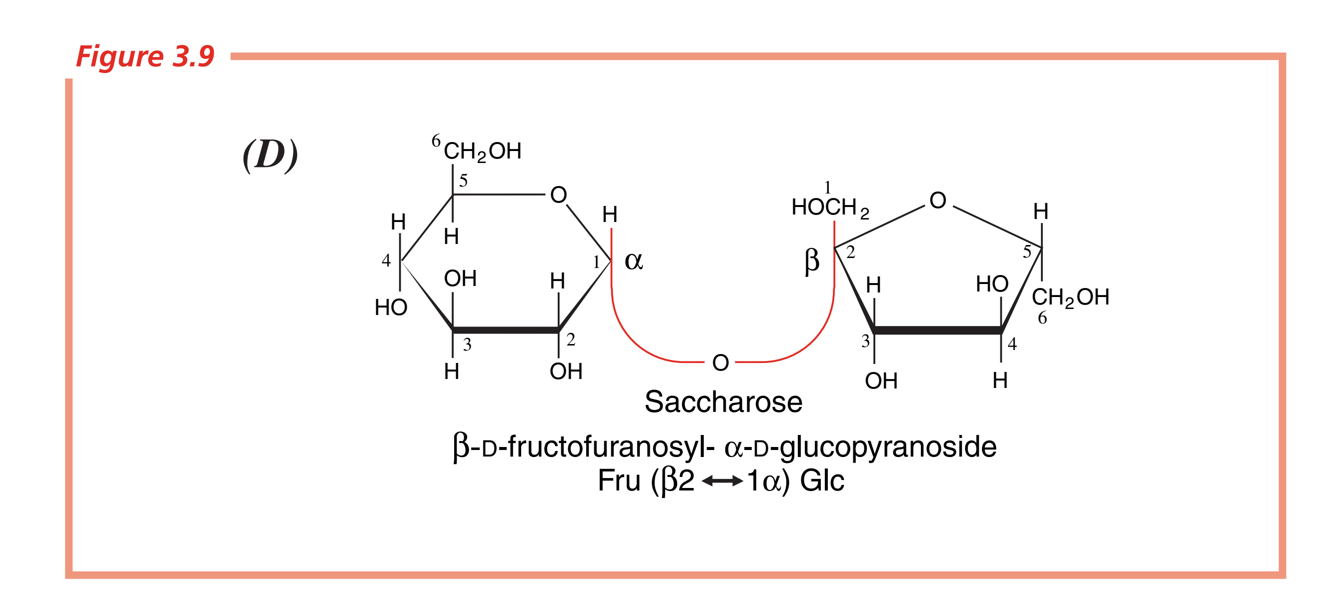
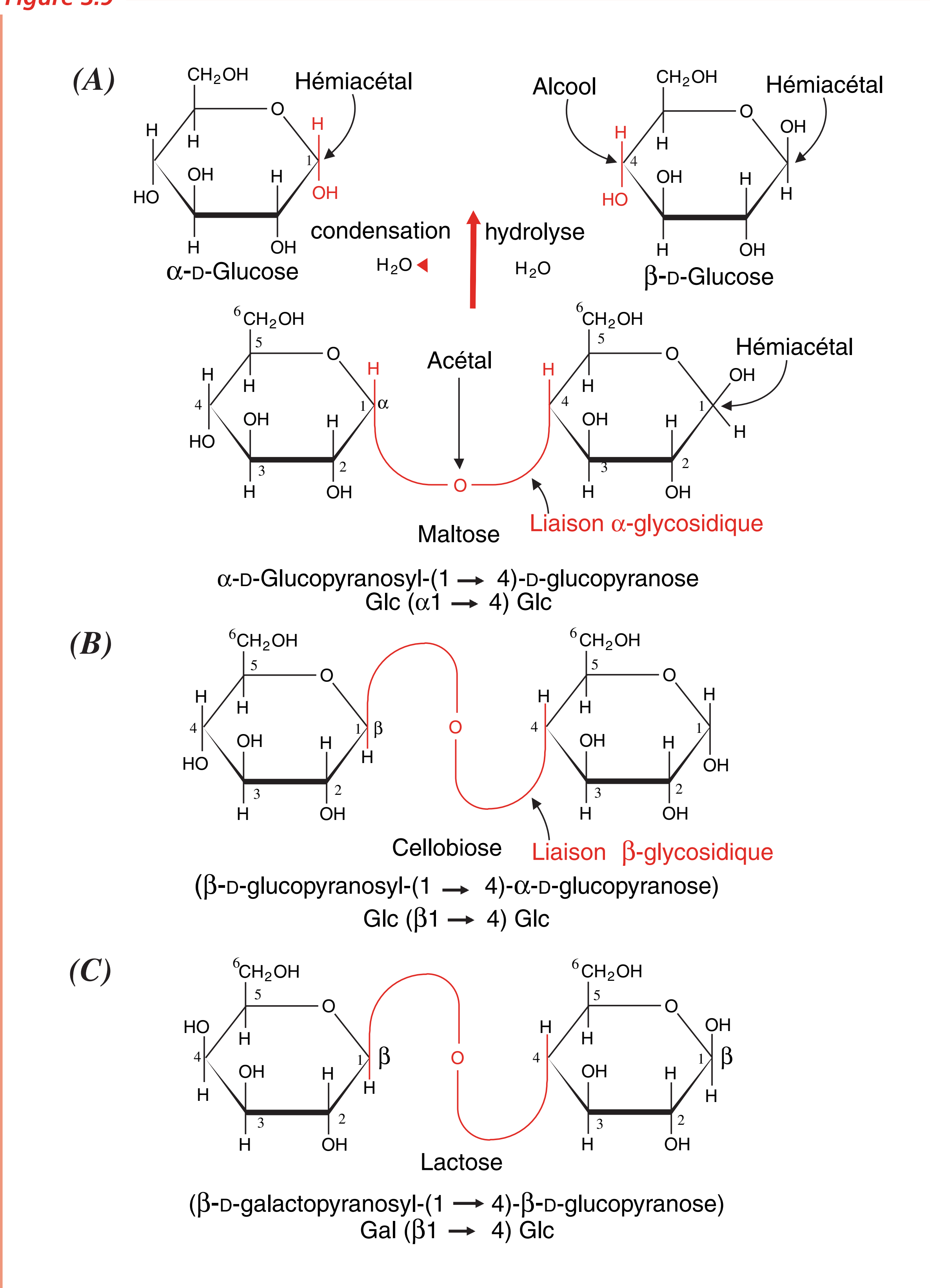


Figure 3.9


(A)
CH_2OH
Hémiacétal
α-D-Glucose
condensation
hydrolyse
H_2O
H_2O
Alcool
Hémiacétal
β-D-Glucose
Acétal
Hémiacétal
Maltose
Liaison α-glycosidique
α-D-Glucopyranosyl-(1 → 4)-D-glucopyranose
Glc (α1 → 4) Glc
(B)
Cellobiose
Liaison β-glycosidique
(β-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-α-D-glucopyranose)
Glc (β1 → 4) Glc
(C)
Lactose
(β-D-galactopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranose)
Gal (β1 → 4) Glc

AMIDON ET GLYCOGÈNE

Les plus importants biopolymères polyosidiques qui permettent la mise en réserve d'énergie sont l'amidon chez les végétaux et le glycogène chez les animaux où ils apparaissent, au sein des cellules, sous la forme de gros granules. Le glycogène est particulièrement abondant dans les hépatocytes (10 % environ du poids de l'organe) et les myocytes (1 à 2 % de la masse musculaire).

L'amidon contient deux types de polymères du D-glucose : l'amylose et l'amylopectine. Dans l'amylose, de longues chaînes non ramifiées sont constituées de résidus glucose unis exclusivement par des liaisons ($\alpha 1 \rightarrow 4$), comme dans le maltose (p. 68) ; leur masse moléculaire va de quelques milliers à plus d'un million. L'amylopectine est formée de chaînes ramifiées où des résidus glucose sont unis par des liaisons ($\alpha 1 \rightarrow 4$), mais aussi par des liaisons ($\alpha 1 \rightarrow 6$) (*Figure 3.10A*) qui initient des ramifications tous les 20 à 30 résidus. La masse moléculaire de ces chaînes est très élevée ; elle peut atteindre plus de 100 millions. Le glycogène, comme l'amylopectine, est un polymère de résidus D-glucose avec des liaisons ($\alpha 1 \rightarrow 4$) et des liaisons ($\alpha 1 \rightarrow 6$) à l'origine de ramifications, mais ces dernières y sont plus nombreuses, une tous les 8 à 12 résidus. Ici aussi, la masse moléculaire des chaînes est très grande.

La conformation des liaisons ($\alpha 1 \rightarrow 4$) (*Figure 3.10B*) est à l'origine de la structure hélicoïdale de l'amylose, de l'amylopectine et du glycogène (*Figure 3.10C*) ; cependant, la nature ramifiée de l'amylopectine et du glycogène s'oppose la formation de longs segments d'hélice. L'iode, réactif très utilisé pour la mise en évidence de l'amidon et du glycogène avec lesquels il donne une coloration bleu ou rouge violet, respectivement, s'insinue à l'intérieur des hélices.

Figure 3.10

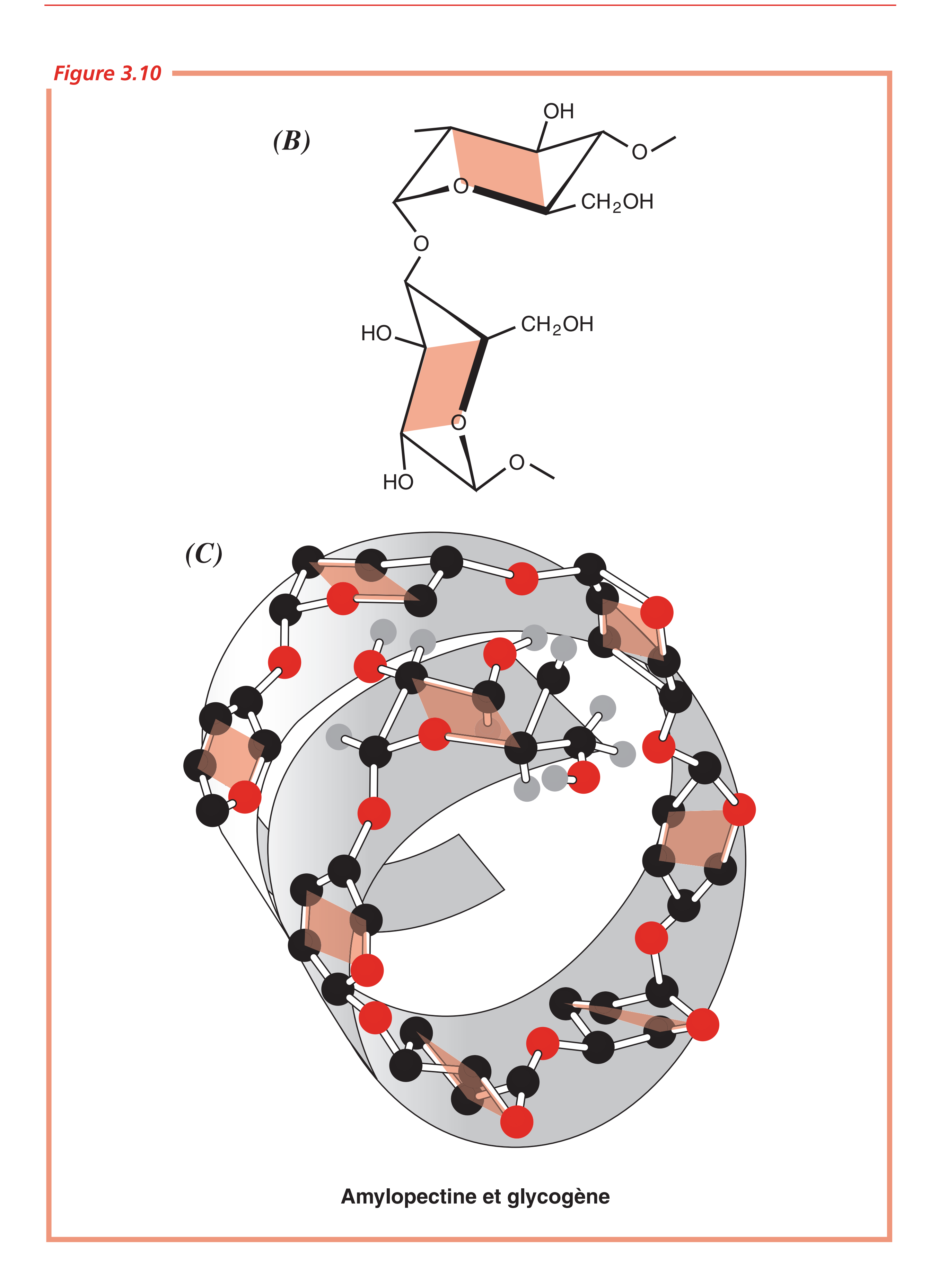
(A)

Amylopectine

Liaison α 1 → 6

Liaison α 1 → 4

Figure 3.10



Amylopectine et glycogène

CELLULOSE ET CHITINE

La cellulose, principal biopolymère de structure des végétaux, est l'un des composés organiques les plus abondants de la biosphère ; c'est un polymère non ramifié constitué de résidus de D-glucose unis exclusivement par des liaisons (β1→4), comme dans le cellobiose (p. 66) ; la configuration β permet aux structures chaise de tourner librement et d'adopter, pour une rotation de 180 ° les unes par rapport aux autres, la conformation la plus stable qui conduit à la constitution de très longues chaînes (*Figure 3.11A*). Ces dernières sont susceptibles de contracter entre elles des liaisons hydrogène et de former alors des fibres très résistantes à l'étirement (*Figure 3.11B*).

La chitine, présente dans l'exosquelette des Crustacés et des Insectes, est un biopolymère non ramifié constitué de résidus *N*-acétylglucosamine unis, eux aussi, exclusivement par des liaisons (β1→4) ; elle a donc une structure fibreuse très semblable à celle de la cellulose (*Figure 3.11C*).

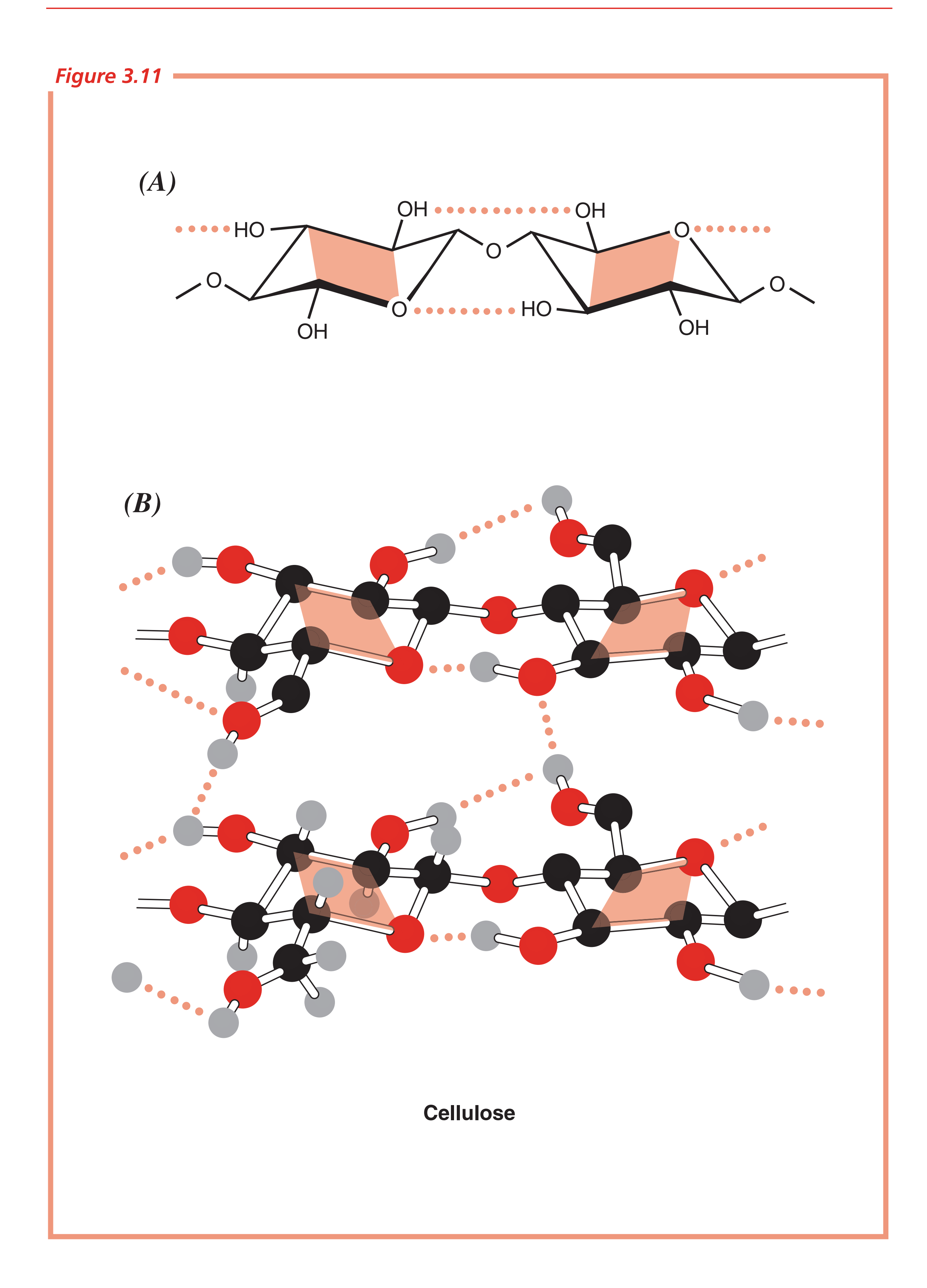
Figure 3.11

(C)

CH_2OH O OH N—H O=C CH_3 1 β O 4 CH_2OH O H OH H H N—H O=C CH_3

Liaison β 1 → 4

Chitine



Cellulose

GLYCOSAMINOGLYCANES

Les glycosaminoglycanes (GAG) constituent un groupe homogène de glycanes linéaires anioniques formés par la répétition de structures diosidiques (*Figure 3.12A à E*), où l'un des résidus est un ose aminé, *N*-acétylglucosamine ou *N*-acétylgalactosamine, et où, sauf dans le kératane sulfate, l'autre résidu est un acide uronique, D-glycuronate ou L-iduronate. À l'exception de l'hyaluronate, un des deux résidus (parfois les deux) présente(nt) au moins un de ses groupes hydroxyle sulfaté. Les GAG, à l'exception de l'hyaluronate, possèdent une séquence commune Gal-Gal-Xyl (*Figure 3.12F*) qui leur permet de se lier à un résidu sérine ou thréonine d'une chaîne polypeptidique par une liaison *O*-glycosidique pour constituer des protéoglycanes ; le kératane sulfate est le seul GAG à pouvoir se fixer par une liaison *N*-osidique.

PROTÉOGLYCANES

Les protéoglycanes se présentent comme des protéines solubles ou sécrétées dans la matrice extracellulaire ou comme des protéines intrinsèques transmembranaires. Dans les protéoglycanes matriciels, les chondroïtines 4- ou 6-sulfate se trouvent dans les cartilages, les tendons, les ligaments et les parois de l'aorte ; le dermatane sulfate est présent dans la peau et certains vaisseaux ; les kératanes sulfate sont rencontrés dans certaines structures cornées : corne, griffe, ongle, mais aussi dans la cornée, les cartilages, les os. Les hyaluronates, d'une masse moléculaire pouvant atteindre 10^7, jamais liés à des protéines, donnent les solutions très visqueuses présentes dans le vitré de l'œil et le liquide synovial des articulations. Les héparanes sulfate constituent une famille très hétérogène ; l'un de ses membres est l'héparine, anticoagulant synthétisé par les mastocytes et sécrété dans le sang circulant où il active l'antithrombine III. Certains protéoglycanes peuvent former des agrécanes, assemblages supramoléculaires où un long filament d'hyaluronate est associé, tous les 30 nm environ, de façon non covalente, par l'intermédiaire de protéines de liaison, à des protéines dénommées protéines du core, elles-mêmes liées par covalence à de nombreuses chaînes de kératane sulfate ou de chondroïtine sulfate (*Figure 3.12G*).

Figure 3.12

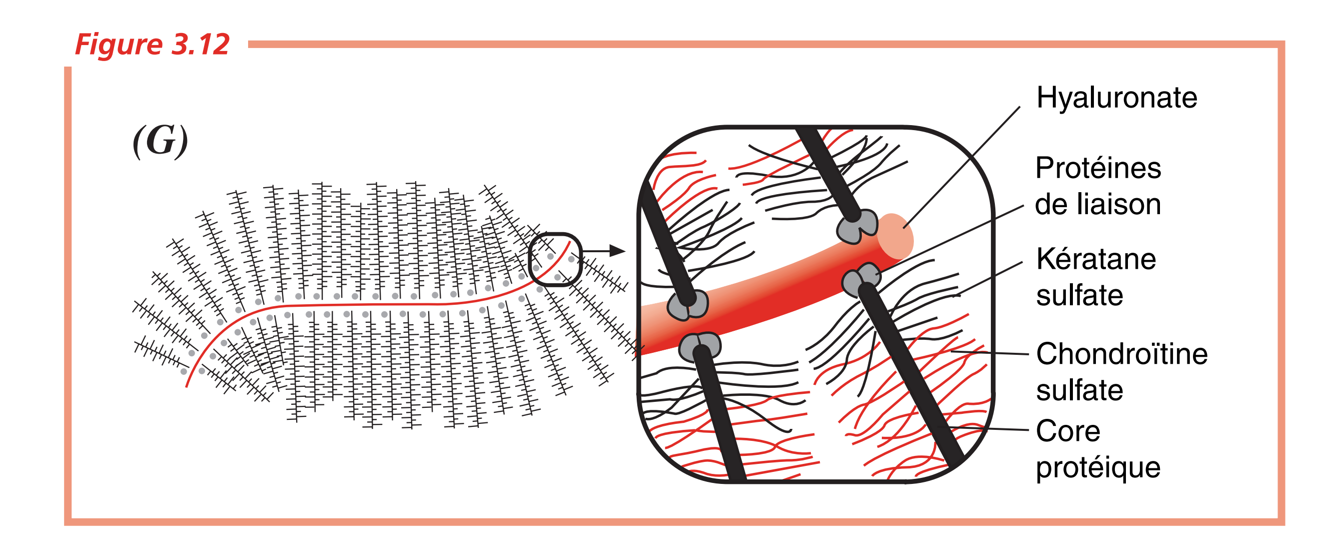


Figure 3.12

(A) Chondroïtine 6-sulfate

COO⁻ ; $CH_2OSO_3^-$; HO ; OH ; NHCOCH$_3$; n

(B) Dermatane sulfate

COO⁻ ; ^-O_3S ; CH_2OH ; OH ; NHCOCH$_3$; n

(C) Kératane sulfate

CH_2OH ; $CH_2OSO_3^-$; HO ; OH ; NHCOCH$_3$; n

(D) Hyaluronate

COO⁻ ; CH_2OH ; HO ; OH ; NHCOCH$_3$; n

(E) Héparine

COO⁻ ; $CH_2OSO_3^-$; OH ; OSO_3^- ; $NHSO_3^-$; n

(F)

(b1→3) (b1→4) (b1→3)(b1→3) (b1→4)

GlcA → GalNAc → GlcA → Gal → Gal → Xyl → Ser ← Protéine

Chondroïtine sulfate — Pont de liaison

Dans le syndécane (*Figure 3.13A*), qui est une protéine transmembranaire, le domaine N-terminal extracellulaire est uni covalenciellement par l'intermédiaire de ponts Gal-Gal-Xyl à trois chaînes de kératane sulfate et deux de chondroïtine sulfate.

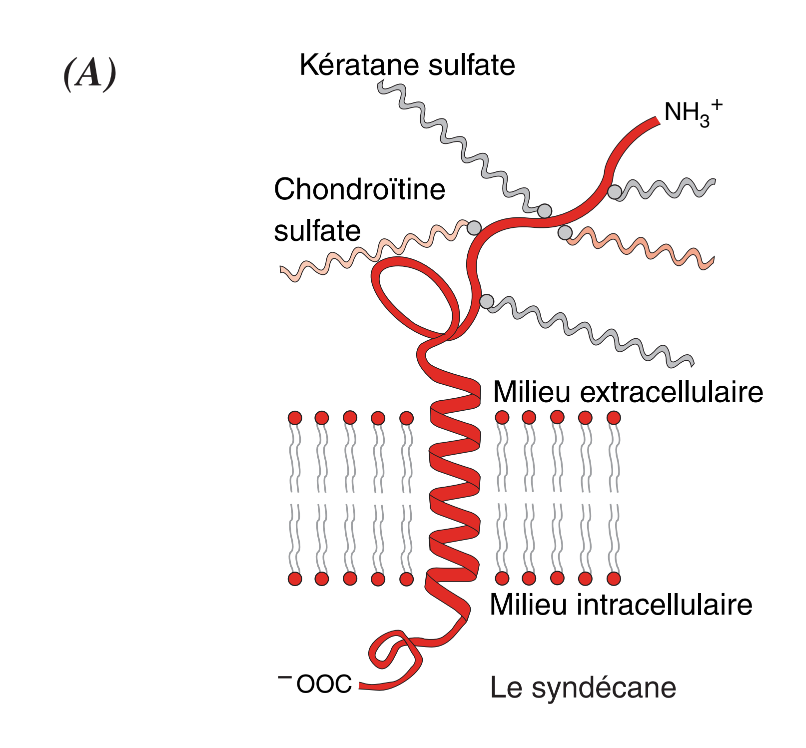
Les deux types de protéoglycanes, protéines solubles ou protéines intrinsèques, interviennent dans de nombreux processus biologiques : ils ont un rôle mécanique et ils établissent des interactions avec nombre d'autres molécules. Ainsi, dans la matrice extracellulaire, les agrécanes, en raison de leur caractère polyanionique, fixent des molécules d'eau et rendent les cartilages flexibles et élastiques ; les protéoglycanes y sont aussi entrelacés avec des protéines fibreuses, telles que le collagène, l'élastine ou la fibronectine, et le réseau de protéines matricielles ainsi constitué est connecté à des protéines intracellulaires par des intégrines (*Figure 3.13B*) et intervient, entre autre, dans la modulation des processus de croissance et de différentiation des cellules.

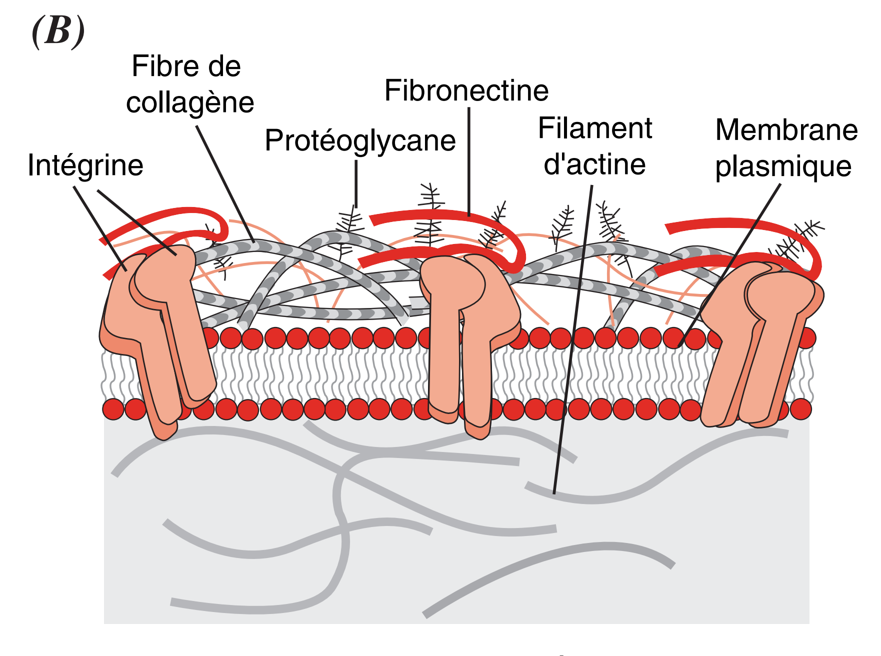
LES GLYCOPROTÉINES

De nombreuses protéines membranaires et la plupart des protéines sécrétées, telles que les immunoglobulines, certaines hormones (FSH, LH, TSH), des protéines du lait, la ribonucléase, les mucines, se présentent comme des glycoprotéines qui contiennent des glycanes formés de chaînes polyosidiques plus courtes mais plus diverses structuralement que les glycosaminoglycanes des protéoglycanes. Certaines glycoprotéines ont une seule chaîne oligosaccharidique, mais nombre d'entre elles en possèdent plusieurs et la partie glucidique peut représenter jusqu'à 70 % de la masse d'une glycoprotéine. La glycosylation est un événement post-traductionnel complexe ubiquitaire qui s'effectue dans la lumière du réticulum endoplasmique et dans le complexe de Golgi ; elle augmente considérablement la complexité du protéome où une protéine donnée peut se présenter comme une population de variants glycosylés, ou glycoformes tissulaires, le plus souvent en rapport avec une fonction biologique.

Quatre types d'oses ou de leurs dérivés sont trouvés dans les glycoprotéines : des oses neutres tels que le D-glucose, le D-mannose, le D-galactose, le L-fucose, le D-furanoarabinose, le D-xylose ; des oses aminés tels que la *N*-acétyl-D-glucosamine, la *N*-acétyl-D-galactosamine ; des acides uroniques tels que l'acide D-glycuronique, l'acide L-iduronique ; nombre d'acides sialiques, parmi lesquels l'acide *N*-acétyl-neuraminique, l'acide *N*-glycolyl-neuraminique ; de plus, certains oses peuvent être sulfatés. Les glycanes diffèrent par leur mode de liaison à la chaîne polypeptidique : glycanes *O*-liés ou *N*-liés.

Figure 3.13





Relations entre les protéoglycanes
et les protéines matricielles ou intracellulaires.

Les *O*-glycanes sont liés à la chaîne polypeptidique par une liaison *O*-glycosidique entre le groupe hydroxyle hémiacétalique de la *N*-acétyl-D-galactosamine et le groupe hydroxyle d'un résidu sérine ou thréonine (*Figure 3.14A*). Ils sont caractérisés par la grande hétérogénéité de la longueur de leur chaîne, qui peut aller de 1 à 20 unités, mais ils sont tous construits sur un même modèle structural (*Figure 3.13B*) avec trois régions distinctes : le core qui inclut la *N*-acétyl-D-galactosamine et un ou deux oses supplémentaires permettant d'en décrire huit types principaux ; le squelette, ou région charnière, fait de séquences de D-galactose et de *N*-acétyl-D-galactosamine ; la périphérie constituée de divers oses ou dérivés d'oses souvent assemblés de façon à former des déterminants antigéniques, tels que ceux des groupes sanguins A, B, O ou de Lewis. Les *O*-glycanes sont très présents dans les mucines, où ils représentent jusqu'à 80 % du poids de la molécule.

Les *N*-glycanes sont liés à la chaîne polypeptidique par une liaison *N*-glycosidique entre le groupe hydroxyle hémiacétalique de la *N*-acétyl-D-glucosamine et le groupe amide d'un résidu asparagine (*Figure 3.14A*) d'une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr, où X est un important déterminant de l'efficacité de la glycosylation. Tous les *N*-glycanes contiennent une structure commune, appelée di-*N*-acétyl-chitobiose trimannosyle à laquelle sont associés d'autres résidus osidiques qui permettent de classer les *N*-glycanes en trois sous-groupes : les *N*-glycanes complexes, les *N*-glycanes riches en résidus mannose et les *N*-glycanes hybrides (*Figure 3.14C à E*).

Figure 3.14

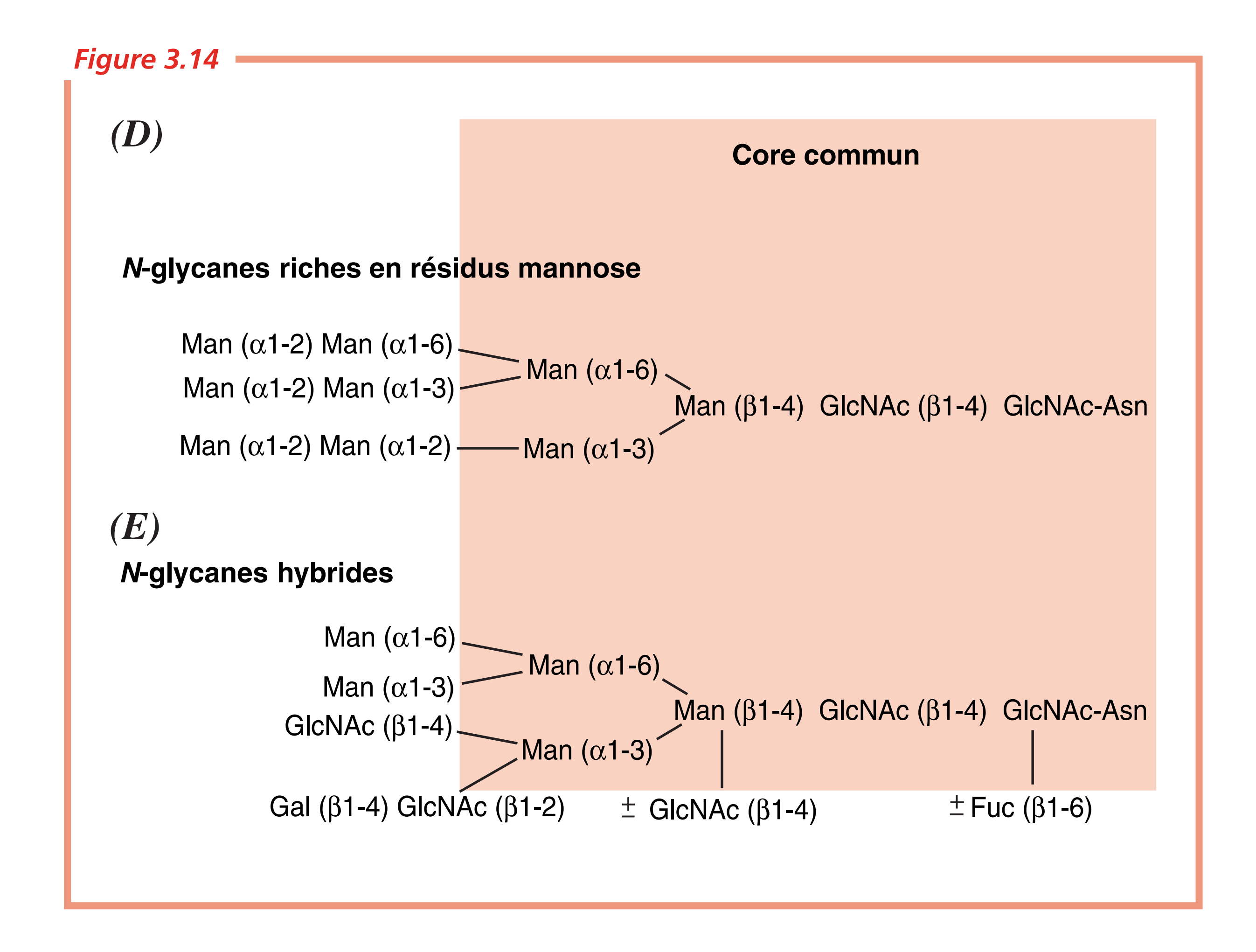




Figure 3.14

(A)

$^6CH_2OH$ — O — CH_2 — CH — NH, C = O

Liaison *O*-glycosidique

N-acétylgalactosamine
liée à un résidu sérine

$^6CH_2OH$ — H — N — C(=O) — CH_2 — CH — NH, C = O

Liaison *N*-glycosidique

N-acétylglucosamine
liée à un résidu asparagine

(B)

Gal, GlcNAc, Gal, GalNAc, GlcNAc — Thr

NeuAc, Gal, GlcNAc, Gal, GalNAc — Thr

Fuc, Gal, GlcNAc, Gal, GlcNAc

GalNAc, Gal — Ser

Périphérie

Squelette

Core

(C)

N-glycanes lactosaminiques ou complexes

Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6)
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6)
Man (α1-6)
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2)
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-4)
Man (α1-3)
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2)

± [GlcNAc (β1-4)]

± Fuc (α1-6)

Core commun

Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc-Asn

LES GLYCOLIPIDES

Les glycolipides constituent un groupe très hétérogène de glycoconjugués définis par la liaison covalente de divers glycanes à différents groupes prosthétiques lipidiques. Dans les organismes supérieurs, on en distingue trois types principaux : les glycoglycérolipides, les glycosphingolipides et les glycosyl-phosphoinositides. Ils sont essentiellement présents dans les membranes des cellules eucaryotes où leurs têtes polaires constituées d'oligosides plus ou moins complexes apparaissent au niveau de la surface externe.

LES LIPOPOLYSACCHARIDES

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des constituants de la membrane externe des bactéries gram négatives (*Figure 3.15*). Ainsi, le LPS de *Salmonella typhimurium* est formé d'un lipide A, glycolipide où six acides gras sont fixés sur deux résidus glucosamine dont l'un est lié à un oligoside complexe. Ce dernier est lui-même formé d'un oligoside basal et d'une chaîne O-spécifique, dont la composition chimique varie d'une souche à l'autre. Certains LPS sont toxiques pour l'Homme et les animaux ; ils peuvent alors être responsables du syndrome de choc toxique observé lors d'infections par des bactéries gram-négatives.


Figure 3.15

Man
AbeOAc
Rha
Gal
Glc
$n > 10$
Man
AbeOAc
Rha
Gal
Man
Man
AbeOAc
Rha
Gal
Glc
GlcNAc
Gal
Glc
Gal
Hep
Hep
Hep
Kdo
Kdo
Kdo
Chaîne O-spécifique
Polysaccharide de base
Lipide A
HO
NH
OH
O

Chapitre 4

Lipides et membranes cellulaires

On regroupe sous le nom de lipides des substances naturelles insolubles dans l'eau mais solubles dans certains solvants organiques tels que le méthanol, le chloroforme, l'acétone. Les lipides ont des structures et des fonctions très diverses ; chez les êtres vivants, certains sont abondants, d'autres sont présents en faible quantité. On classe les lipides en fonction de leur nature chimique et du rôle qu'ils tiennent dans la structure et le fonctionnement des organismes.

Les lipides de réserve, c'est-à-dire les huiles et les graisses, sont des triacylglycérols qui représentent une importante réserve d'énergie sous forme concentrée chez la plupart des êtres vivants ; de plus, lorsqu'ils sont localisés sous la peau, ils apportent une protection efficace contre le froid. Les lipides de structure sont des phospholipides et des sphingolipides qui s'associent pour former une double couche lipidique ; cette dernière constitue, avec le cholestérol, les membranes biologiques qui délimitent les cellules ou les organites intracellulaires tels que le noyau, les mitochondries, les chloroplastes, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes ou les lysosomes ; pour cette raison, les phospholipides et des sphingolipides sont appelés habituellement lipides membranaires. Tous ces lipides contiennent dans leur structure des acides gras où ces derniers apparaissent comme les constituants élémentaires clés.

Par ailleurs, d'autres lipides, bien que présents en quantité moindre, jouent des rôles fonctionnels d'une grande importance. Ainsi, appartiennent au groupe des lipides les sels biliaires qui participent à la digestion et l'assimilation des lipides de l'alimentation, les hormones stéroïdes, les hormones eicosanoïdes, les vitamines liposolubles A, D, E et K qui interviennent dans la régulation de nombreux processus biologiques fondamentaux, des pigments susceptibles d'absorber la lumière, des cofacteurs enzymatiques, des transporteurs d'électrons, des ancres hydrophobes et des messagers intracellulaires. Ces biomolécules sont étudiées dans d'autres chapitres de ce livre.

LES ACIDES GRAS

Les acides gras les plus répandus (*Tableau 4.1*) sont des chaînes hydrocarbonées non ramifiées, le plus souvent à nombre pair de carbones, de longueur variable, de 12 à 24 carbones, se terminant par un groupe carboxyle ; ces chaînes peuvent être entièrement saturées ou présenter une ou plusieurs doubles liaisons. Les atomes de carbone sont numérotés à partir du carboxyle et le carbone du méthyle est appelé ω ; la position d'une double liaison est indiquée par le symbole Δ suivi d'un nombre en exposant qui donne le numéro du premier carbone impliqué. Dans la plupart des acides gras monoinsaturés, la double liaison se situe entre les carbones C-9 et C-10 (Δ^9) et dans les acides gras polyinsaturés les autres doubles liaisons sont habituellement en Δ^{12} et Δ^{15} ; l'acide arachidonique 20 : 4($\Delta^{5,8,11,14}$), précurseur des hormones eicosanoïdes, est une remarquable exception. Les doubles liaisons des acides gras ne sont presque jamais conjuguées et le plus habituellement elles se présentent dans la configuration *cis*. La chaîne hydrocarbonée des acides gras a une certaine flexibilité, mais la conformation étirée (*Figure 4.1A*), où les interactions stériques sont les plus faibles, est la forme la plus stable ; de plus, cette conformation permet aux acides gras, dont les atomes peuvent alors entrer en contact de van der Waals tout au long de la chaîne, de former des agrégats stables

Les propriétés physiques des acides gras sont essentiellement fonction de la longueur et du degré d'insaturation de la chaîne carbonée : ainsi, plus la chaîne est courte ou plus il y a de doubles liaisons, plus le point de fusion est bas, ce qui augmente la fluidité, tant des acides gras eux-mêmes que des lipides à la constitution desquels ils participent.

Certains acides gras polyinsaturés tels que le linoléate ($\Delta^{9,12}$) et l'α-linolénate ($\Delta^{9,12,15}$) ne peuvent pas être synthétisés par les mammifères ; ils sont dits essentiels car ce sont des précurseurs indispensables qui doivent donc être apportés par l'alimentation.

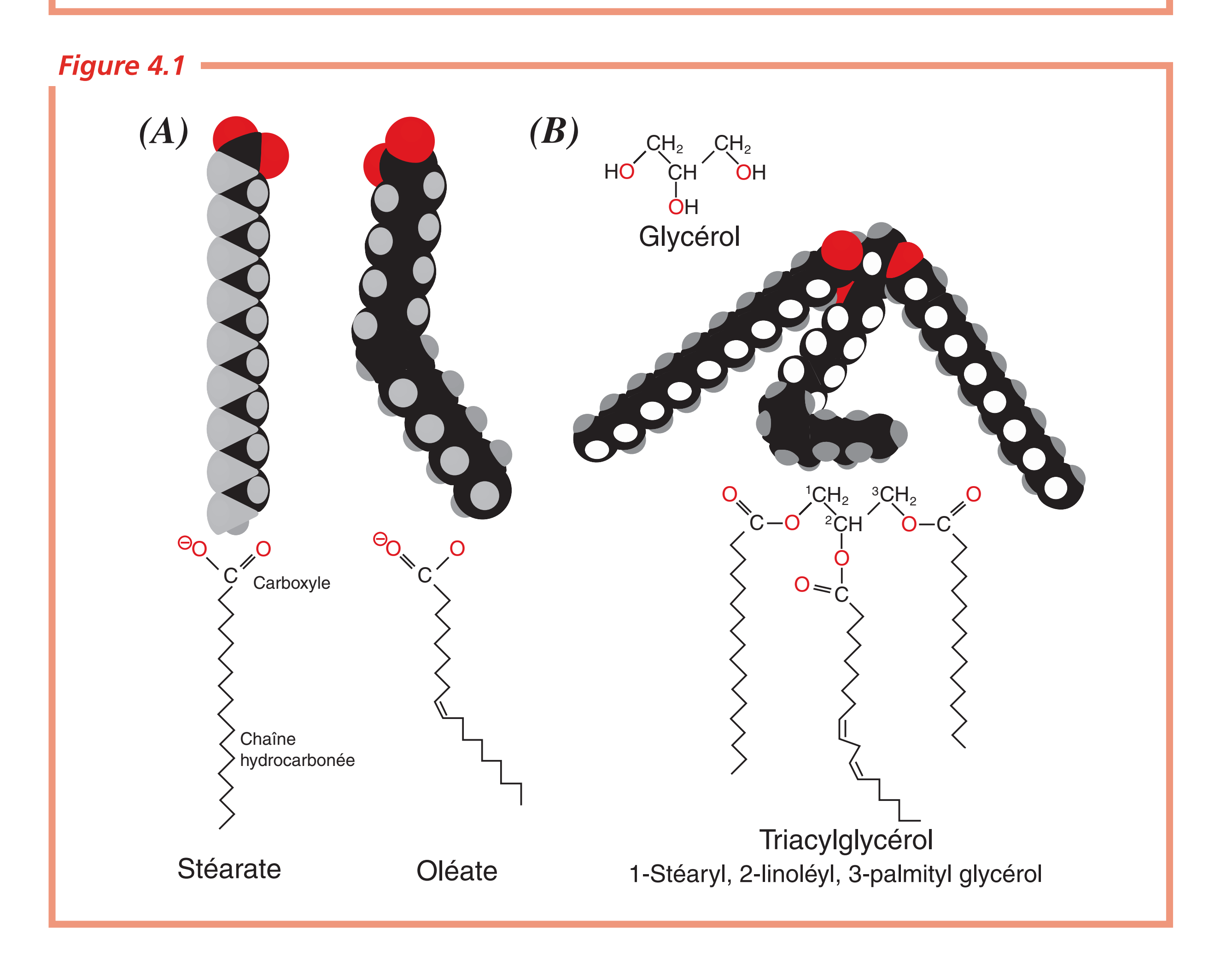
LIPIDES DE RÉSERVE : LES TRIACYLGLYCÉROLS

Les lipides de réserve, encore dénommés graisses ou huiles, sont essentiellement des triacylglycérols (ou triglycérides) car ce sont des esters de glycérol et d'acides gras (*Figure 4.1B*). Le glycérol présente trois fonctions alcool qui peuvent être estérifiées par un acide gras, ce qui conduit successivement à des mono-, di- et triacylglycérols. Ces derniers sont dénommés d'après les acides gras qui les constituent ; par exemple, tripalmitine, tristéarine ou trioléine, pour les triacylglycérols contenant trois palmitates, trois stéarates ou trois oléates, respectivement ; pour les triacylglycérols mixtes, les plus habituellement rencontrés dans les graisses naturelles, la nature et la position de chaque acide gras sont indiquées, par exemple 1-stéaryl, 2-linoléyl, 3-palmityl glycérol. Les graisses extraites des milieux biologiques contiennent habituellement un mélange complexe de triacylglycérols présentant fréquemment un acide gras insaturé au niveau du C-2 du glycérol. Les triacylglycérols sont des molécules apolaires, hydrophobes, de densité inférieure à celle de l'eau.

Tableau 4.1

Nom	Nombre de carbone	Nombre de doubles liaisons	Position des doubles liaisons	Formule
Laurate	12	0		$CH_3(CH_2)_{10}COO^-$
Myristate	14	0		$CH_3(CH_2)_{12}COO^-$
Palmitate	16	0		$CH_3(CH_2)_{14}COO^-$
Palmitoléate	16	1	9	$CH_3(CH_2)_5CH{=}(CH_2)_7COO^-$
Stéarate	18	0		$CH_3(CH_2)_{16}COO^-$
Oléate	18	1	9	$CH_3(CH_2)_7CH{=}(CH_2)_7COO^-$
Linoléate	18	2	9, 12	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_2(CH_2)_6COO^-$
α-Linolénate	18	3	9, 12, 15	$CH_3(CH_2)_{10}(CH{=}CHCH_2)_3(CH_2)_6COO^-$
Arachidate	20	0		$CH_3(CH_2)_{18}COO^-$
Arachidonate	20	4	5, 8, 11, 14	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_4(CH_2)_2COO^-$
Béhénate	22	0		$CH_3(CH_2)_{20}COO^-$
Lignocérate	24	0		$CH_3(CH_2)_{22}COO^-$

Figure 4.1



Dans le sang, les triacylglycérols sont contenus dans des lipoprotéines : chylomicrons pour les triacylglycérols d'origine alimentaire, VLDL pour les triacylglycérols endogènes. Dans la plupart des cellules eucaryotes, ils se présentent sous forme de fines gouttelettes qui constituent une importante réserve d'énergie métabolique très concentrée. Dans les adipocytes, cellules qui chez les Vertébrés sont spécialisées dans le stockage des triacylglycérols, ces derniers occupent la presque totalité du volume cellulaire. Les triacylglycérols constituent une source d'énergie beaucoup plus avantageuse que les polysaccharides tels que le glycogène ou l'amidon car ils sont plus réduits et anhydres (p. 68). Ainsi, ils permettent aux oiseaux migrateurs d'effectuer un vol ininterrompu sur de très longues distances. Chez certains animaux tels que les Cétacés où ils sont emmagasinés sous la peau, ils jouent le rôle de réserve énergétique, mais aussi d'isolant protecteur contre le froid.

LIPIDES MEMBRANAIRES : LES GLYCÉROPHOSPHOLIPIDES ET LES SPHINGOLIPIDES

Les glycérophospholipides (*Figure 4.2A*) dérivent des phosphatidates. Ces composés sont des esters construits à partir d'un squelette, le glycérol, dont les hydroxyles en C-1 et C-2 sont estérifiés par des acides gras qui peuvent être très divers et dont l'hydroxyle en C-3 est estérifié par l'acide phosphorique. Dans les glycérophospholipides, ce dernier est lui-même estérifié par un alcool chargé positivement, tel que l'éthanolamine ou la choline, neutre, tel que la sérine ou le glycérol, ou chargé négativement, tel que l'inositol 4,5-bisphosphate ; cet alcool constitue une tête polaire. Ainsi, les glycérophospholipides adoptent une forme d'ensemble parallélépipédique rectangle et se présentent comme des molécules amphipathiques. En raison de la diversité des acides gras et des alcools constituants des glycérophospholipides, il existe une très grande variété de ces composés dont la distribution dans les cellules est corrélée à la différentiation et à la spécialisation fonctionnelle spécifique d'un tissu ou d'un organe.

Les sphingolipides (*Figure 4.2B*) qui constituent le deuxième groupe de lipides membranaires, dérivent des céramides. Ces composés ont pour squelette, non pas le glycérol, mais un aminoalcool à longue chaîne insaturée, la sphingosine, dont les carbones C-1,C-2 et C-3 sont structuralement analogues aux trois carbones du glycérol des glycérophospholipides. Lorsqu'un acide gras amidifie la sphingosine, il en résulte un céramide dont dérivent diverses sous-classes de sphingolipides. Ainsi, dans les sphingomyélines, l'hydroxyle en C-1 de la sphingosine est estérifié par la phosphoéthanolamine ou la phosphorylcholine qui constituent des têtes polaires ; elles sont donc structuralement analogues à la phosphatidyléthanolaline et à la phosphatidylcholine et se présentent, elles aussi, comme des molécules amphipathiques. Les sphingomyélines sont présentes dans les membranes plasmiques des cellules animales et tout particulièrement dans les gaines de myéline qui entourent et isolent les axones de certains neurones. Dans les glycosphingolipides, l'hydroxyle en C-1 de la sphingosine est uni à un ou plusieurs oses, ce qui conduit alors à un cérébroside ou un ganglioside. De très nombreux sphingolipides ont été identifiés dans les membranes cellulaires. Certains sont d'importants constituants des membranes plasmiques des neurones et beaucoup sont des sites de reconnaissance de la surface cellulaire, tels ceux qui définissent les groupes sanguins.

Figure 4.2

(A) **Glycérophospholipides**

Phosphatidate (diacylglycérol 3-phosphate)

Phosphatidyléthanolamine

Éthanolamine

R_1 C O CH_2 O R_2 C O C H O H_2C O P O O H_2C NH_3^+ C H_2

HO H_2C NH_3^+ C H COO^-

Sérine

HO H_2C $C H_2$ N^+ CH_3 CH_3 CH_3

Choline

HO H H H H OH OH HO OH H H OH

Inositol

Diphosphatidyl glycérol (cardiolipine)

R_1 C O CH_2 O R_2 O C H O C O H_2C O P O O H_2C C H OH H_2C O P O O CH_2 C H O H_2C O C R_3 O C R_4 O

(B) **Sphingolipides**

Sphingosine 18 4 3 2 1 H_3N H C OH C H_2 HO H

Sphingomyélines

Acide gras : R C O HN H $H_3C(H_2C)_{12}$ C C C H_2 HO H O P O O – O N^+ CH_3 CH_3 CH_3

Céramide

Phosphoryl choline

Glycolipides

Acide gras : R C O NH H $H_3C(H_2C)_{12}$ C C C H_2 HO H O

Glucose ou galactose

Cérébroside

Neu5Ac

Glc

Gal

GalNac

Ganglioside GM2

STÉROLS ET STÉROÏDES

Les stérols et les stéroïdes sont formés par la fusion de quatre cycles hydrocarbonés : trois de type cyclohexanique en forme chaise avec un plan équatorial et des liaisons équatoriales ou axiales (les cycles A, B et C) et un de type cyclopentanique en forme enveloppe (le cycle D). La fusion des cycles peut s'opérer selon une conformation *trans* ou une conformation *cis* (*Figure 4.3A*). Les cycles sont fusionnés et les carbones numérotés comme il est indiqué sur la *figure 4.3B*. Un substituant situé en dessus du plan d'ensemble des quatre cycles est dit orienté en β, ce qui est indiqué par une liaison en trait plein ; en revanche, un substituant placé en dessous de ce plan est dit orienté en α, ce qui est figuré par un pointillé. Nombre de stérols et de stéroïdes ont deux groupes méthyle angulaires : le méthyle C-18 fixé sur le C-13 et le méthyle C-19 fixé sur le C-10, tous deux orientés en β.

Chez les Eucaryotes, tous les stérols, et donc leurs dérivés, sont synthétisés à partir d'unités isopréniques (*Figure 4.3C*) à cinq carbones.

Le cholestérol

Le cholestérol (*Figure 4.3D*), stérol en C-27, possède une chaîne hydrocarbonée fixée sur le C-17 (en 17β) et un groupe hydroxyle au niveau du C-3 (en 3β) et présente une double liaison Δ^5 ; il est donc amphipathique, avec un core hydrocarboné non polaire, le noyau stéroïde et la queue hydrocarbonée, et une tête polaire, le groupe hydroxyle. Le cholestérol est le principal stérol des tissus animaux où il est l'un des constituants des membranes, mais il est aussi le précurseur de nombre de molécules douées d'une activité biologique importante, tels que les sels biliaires qui interviennent dans la digestion des graisses (p. 332), les hormones stéroïdes et la vitamine D qui régulent l'expression de certains gènes (p. 334, 335 et 376).

Le cholestérol est apporté par l'alimentation mais il est aussi synthétisé de novo, essentiellement dans le foie, mais aussi dans l'intestin. Il est transporté dans les fluides corporels sous forme d'esters d'acides gras au sein de particules lipoprotéiques : les chylomicrons et les restes de chylomicrons pour le cholestérol d'origine alimentaire, les LDL et les HDL pour le cholestérol endogène (p. 330).

Figure 4.3

(D)

H_3C 21, 22, 24, CH_3 26, CH_3, 20, 23, 25, CH_3 27, CH_3, HO

Cholestérol

→ Sels biliaires

→ Vitamine D

→ Hormones stéroïdes


(A)
H
H(α)
Fusion *trans*
H
H(β)
Fusion *cis*
(B)
Structure polycyclique des stérols et des stéroïdes
Fusion *trans*
Fusion *trans*
Fusion *trans*
17
16
13
D
12
15
11
C
14
8
10
9
B
7
1
6
A
5
2
4
3
Plans équatoriaux
Modèle moléculaire
(β) H
CH3
11
13
12
O
D
17
19 (β) CH3
C
10
2
1
9
8
15
16
A
B
14
(β) HO
3
4
5
6
7
H (α)
H (α)
H (α)
H (α)
Fusion *trans*
Fusion *trans*
Fusion *trans*
Représentation stéréochimique
12
11
13
17
C
D
16
1
9
10
14
15
2
8
A
B
3
5
7
4
6
Projection sur un plan
(C)
H3C
CH2
C—C
H2C
H
Isoprène

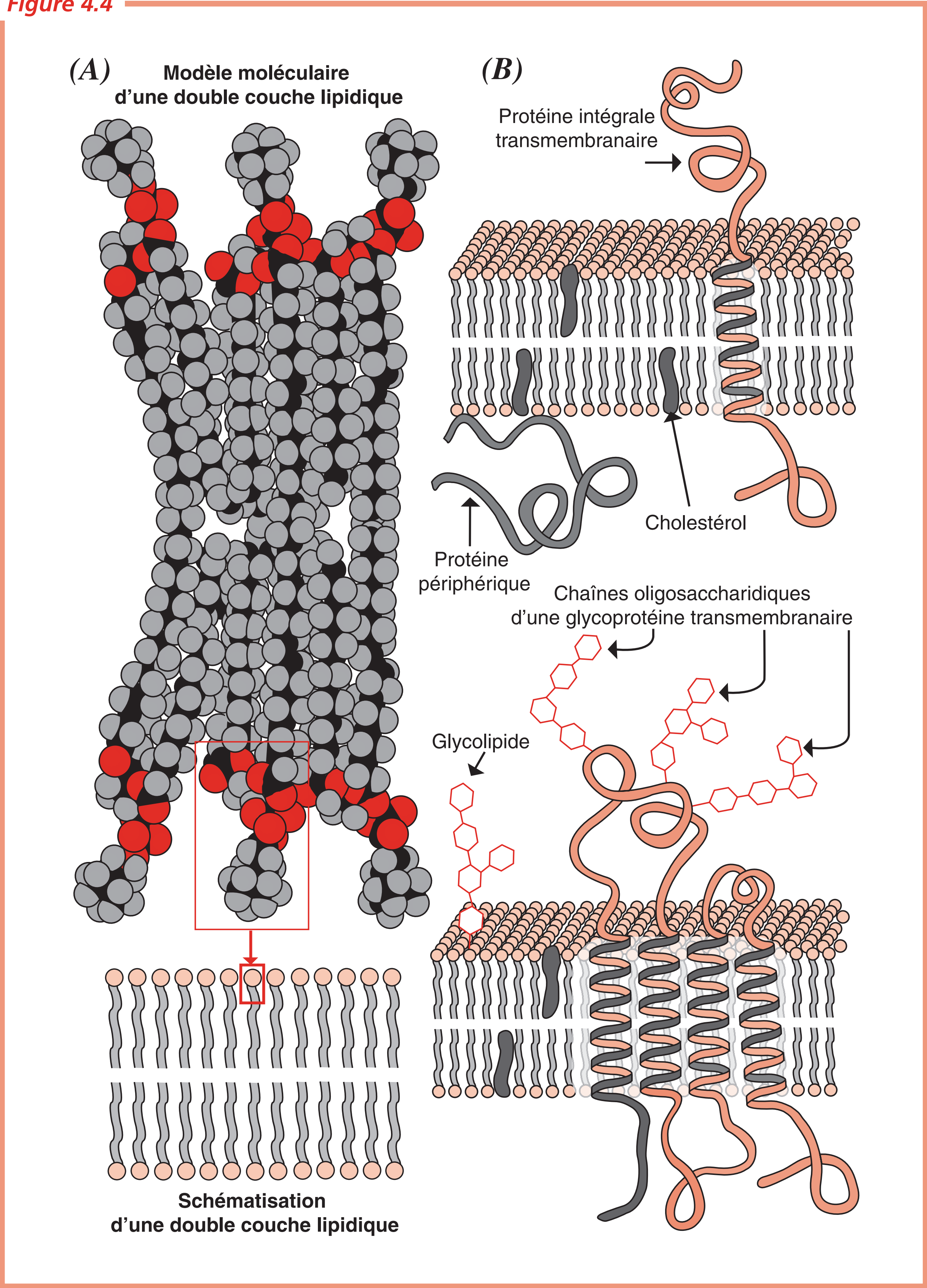
Figure 4.3

DOUBLE COUCHE LIPIDIQUE ET MEMBRANES BIOLOGIQUES

En raison de leur nature amphipathique et de leur forme parallélépipédique relativement volumineuse, les phospholipides et les sphingolipides ont une forte tendance à former une double couche (*Figure 4.4A*) qui peut être de grandes dimensions et où peut venir s'insérer le cholestérol, lui aussi amphipathique, mais quasiment plan. Les têtes polaires sont au contact du milieu aqueux environnant tandis que les queues hydrophobes s'associent les unes aux autres afin d'éviter le contact avec l'eau. Une double couche lipidique résulte donc d'un processus d'auto-assemblage spontané et rapide imposé par des interactions hydrophobes ; de plus, elle est stabilisée par les forces de van der Walls qui s'exercent latéralement entre les queues hydrophobes et par les liaisons hydrogène ou électrostatiques que contractent les groupes polaires des têtes avec les molécules d'eau de l'environnement. Les membranes biologiques sont très précisément décrites par le modèle de la mosaïque fluide où une double couche lipidique enserre des protéines transmembranaires intégrales et s'associe à des protéines périphériques (*Figure 4.4B*). Les membranes biologiques se présentent comme une barrière imperméable aux ions (Na^+, K^+, Ca^{2+}) et aux molécules polaires (aminoacides, glucides, nucléotides) mais où des protéines spécifiques effectuent toutes les autres fonctions membranaires, en particulier le transport des substances polaires ou volumineuses et la transduction de l'information. Elles sont donc susceptibles de former des compartiments au sein des organismes en délimitant les cellules et les organites intracellulaires. De plus, les lipides y créent un environnement favorable pour l'action des protéines.

La composition en lipides et glycolipides membranaires diffère selon les espèces, les tissus, les cellules et les organites dont elle assure la spécificité. Chaque cellule possède des mécanismes qui permettent de contrôler la nature et la quantité des lipides à synthétiser et à adresser aux membranes. De même, la composition en protéines membranaires est largement différente selon les cellules et les organites dont elle reflète la spécialisation fonctionnelle. Les membranes plasmiques contiennent environ 50 % de protéines qui jouent le rôle de canaux, de pompes, de récepteurs ou d'enzymes. Les membranes des mitochondries ainsi que celles des chloroplastes, qui assument la transduction de l'énergie, ont même des taux de protéine plus élevés, de l'ordre de 75 %. Certaines protéines des membranes plasmiques fixent par covalence des glucides au niveau de résidus aminoacide tels que la sérine, la thréonine et l'asparagine (p. 66) et sont alors susceptibles de reconnaître des ligands spécifiques. En revanche, les membranes intracellulaires, telles que celles des mitochondries et des chloroplastes ne contiennent que très exceptionnellement des glucides. Les lipides sont libres de diffuser latéralement dans le plan de la double couche où ils sont en fait continûment en mouvement ; en revanche la diffusion d'une molécule lipidique d'une face à l'autre (« flip-flop ») est beaucoup plus rare. Les protéines, qui « flottent » dans les lipides, peuvent elles aussi diffuser latéralement. Certaines protéines membranaires s'associent en larges agrégats à la surface des membranes ; c'est le cas du récepteur de l'acétylcholine au niveau des synapses neuronales. D'autres sont ancrées au cytosquelette des cellules ; c'est le cas de la glycophorine (p. 25) qui est fixée à la spectrine de la membrane des cellules rouges du sang.

Figure 4.4


(A)
Modèle moléculaire d'une double couche lipidique
Schématisation d'une double couche lipidique
(B)
Protéine intégrale transmembranaire
Cholestérol
Protéine périphérique
Chaînes oligosaccharidiques d'une glycoprotéine transmembranaire
Glycolipide

PARTIE II

CATALYSE BIOLOGIQUE : STRUCTURE ET MÉCANISME D'ACTION DES ENZYMES

Comme il a déjà été mentionné dans la première partie de ce livre, l'une des conditions fondamentales pour qu'un être puisse être considéré comme vivant est qu'au sein de l'architecture moléculaire qui le définit, il soit capable d'effectuer, avec une extrême spécificité et une grande efficacité, tout un ensemble de réactions chimiques qui lui permettent d'assumer des relations dynamiques avec son environnement.

En fait, toutes les réactions qui concourent aux performances et au développement des êtres vivants sont déclenchées et régulées par un (ou une) enzyme. Les enzymes sont des protéines qui jouent le rôle de catalyseur en ce sens qu'elles font évoluer plus rapidement la réaction vers son point d'équilibre sans toutefois modifier la position de ce dernier.

L'un des caractères les plus évidents de l'action catalytique des enzymes est son extrême spécificité qui est double. Chaque enzyme ne catalyse qu'un seul type de réaction, par exemple une hydrolyse ou le transfert d'un certain groupe d'atomes. De plus, chaque enzyme agit exclusivement sur un seul substrat ou sur une classe de composés possédant en commun certains éléments bien définis d'architecture moléculaire. Cette spécificité d'action des enzymes résulte de la propriété de reconnaissance discriminative stéréospécifique d'autres molécules que possède toute protéine globulaire. Ainsi, tels des démons de Maxwell, les enzymes sont capables de reconnaître les molécules avec une extrême précision. Cette fonction cognitive est le fondement du pouvoir catalytique et de la création d'un ordre biologique.

La spécificité d'action des enzymes permet de les dénommer et de les classer selon les réactions qu'ils catalysent. Quelques enzymes ont reçu un nom commun tel que trypsine, chymotrypsine ou papaïne qui est encore utilisé. Cependant, la plupart des enzymes sont désignés en ajoutant le suffixe « ase » au nom du substrat sur lequel ils agissent : ATPase, DNase, ou à un terme décrivant la réaction catalysée : glucose 6-phosphate deshydrogénase, pyruvate carboxylase.

Les enzymes sont répartis selon le type de réaction qu'ils catalysent en six classes, elles-mêmes subdivisées en sous-classes permettant de mieux définir la fonction de chaque enzyme :

1. Les oxydoréductases catalysent les réactions d'oxydo-réduction. La plupart de ces enzymes sont connus sous le nom de deshydrogénases, mais certains d'entre eux sont appelés oxydases, peroxydases, oxygénases ou réductases.

2. Les transférases catalysent les réactions de transfert de groupes moléculaires d'une molécule à une autre. Cette classe inclut les kinases.

3. Les hydrolases catalysent les clivages hydrolytiques.

4. Les lyases catalysent les réactions d'élimination d'un substrat, non hydrolytique et non oxydative, ou lyse, avec création d'une double liaison. Dans le sens inverse, les lyases catalysent l'addition d'un substrat à une double liaison d'un second substrat ; une lyase qui catalyse une réaction d'addition dans les cellules est souvent appelée synthase.

5. Les isomérases catalysent les réactions d'isomérisation ou les réarrangements intramoléculaires.

6. Les ligases catalysent les réactions de ligation au cours desquelles deux molécules sont unies. Ces réactions nécessitent un apport d'énergie chimique, le plus souvent sous forme d'ATP. Les ligases sont aussi dénommées synthétases.

Chaque enzyme a un numéro de code qui permet d'identifier la classe et les sous-classes auxquelles il appartient.

Le mécanisme d'action des enzymes a été initialement mis en évidence par une approche phénoménologique fondée sur l'analyse des résultats de la cinétique des réactions enzymatiques, tels qu'ils sont présentés dans le chapitre 5. Par la suite, ces mécanismes ont été confirmés et précisés dans nombre de cas par une approche structurale fondée sur la connaissance de la structure moléculaire des enzymes, de leurs substrats et des complexes qu'ils forment ensemble, comme il est décrit dans les chapitres 6 et 7.

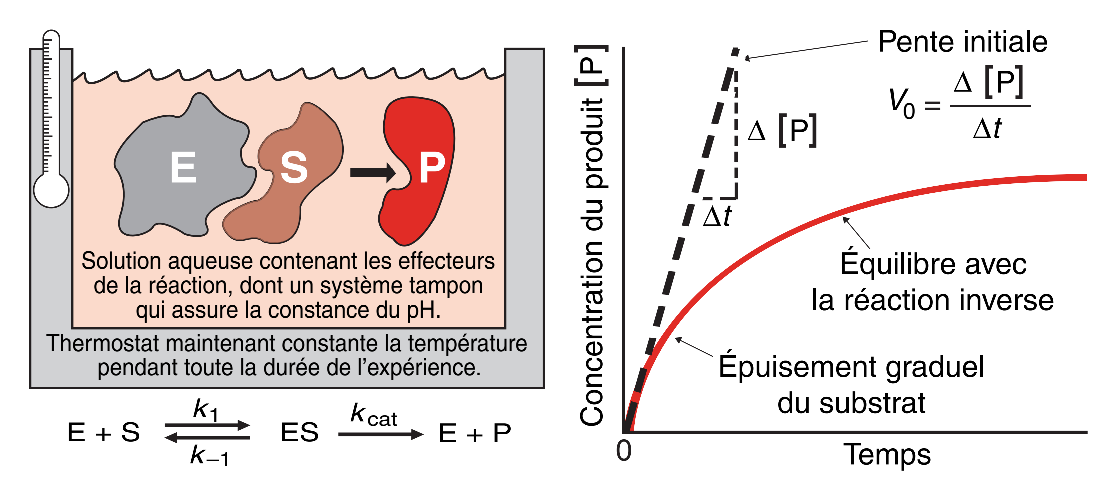
Une réaction enzymatique comporte deux étapes. La première consiste en la formation d'un complexe stéréospécifique entre l'enzyme et son substrat. Ce complexe a deux fonctions : le choix exclusif du substrat, déterminé par la structure stérique de ce dernier, et la présentation du substrat selon une orientation précise par rapport à l'enzyme. La seconde est l'activation catalytique de la réaction au sein du complexe. Cette réaction est orientée et spécifiée par la structure du complexe et conduit à la transformation du substrat en produit.

Outre la découverte des mécanismes des réactions qui caractérisent les êtres vivants, l'étude des enzymes a une très grande importance pratique. Elle conduit à la compréhension de nombreuses maladies telles que les maladies génétiques où il y a un déficit, voire une absence totale d'un ou de plusieurs enzymes. De plus, dans certaines pathologies, la mesure de l'activité de certains enzymes tissulaires ou plasmatiques est un élément important du diagnostic et/ou du pronostic. Le mécanisme d'action de nombre de médicaments peut être compris en termes moléculaires lorsqu'il fait intervenir une interaction entre ces derniers et des systèmes enzymatiques spécifiques. Enfin, les enzymes sont de puissants outils dans l'agriculture, l'industrie alimentaire et même dans certaines industries chimiques.

Chapitre 5

Cinétique enzymatique

Les expériences de cinétique enzymatique donnent des relations entre la vitesse de réaction V, c'est-à-dire la quantité de substrat S disparu ou la quantité de produit P formé par unité de temps au cours d'une réaction : $V = -\Delta[S]/\Delta t = \Delta[P]/\Delta t$, et les conditions expérimentales dans lesquelles se déroule cette réaction, c'est-à-dire la concentration du ou des substrats [S1], [S2]..., la concentration de l'enzyme [E], la température T, le pH et la concentration des effecteurs de la réaction. Au cours d'une expérience de cinétique enzymatique, on mesure habituellement les variations de V en fonction d'un seul de ces paramètres, tous les autres demeurant fixes.



Ainsi, dans le cas simple S → P, il convient de porter sur un diagramme le nombre de moles de produit P accumulé (ou de substrat S consommé) par unité de volume de solution en fonction du temps t, à partir de l'instant initial t_0 où la solution contenant l'enzyme est ajoutée à celle contenant le substrat et les effecteurs, la température étant maintenue constante. Pendant un temps assez bref, l'accumulation du produit est linéaire en fonction du temps, ce qui signifie que la vitesse de réaction est constante pendant la période initiale où S → P. Par la suite, la réaction se ralentit, puis s'arrête ; le ralentissement est dû à l'épuisement graduel du substrat et l'arrêt à l'équilibre avec la réaction inverse P → S. Dans les expérimentations de cinétique enzymatique simples, afin d'étudier dans des conditions expérimentales comparables la vitesse d'une réaction en fonction de la concentration des molécules qui y prennent part et de la température, on se limite à l'étude de la vitesse initiale V_0, c'est-à-dire la vitesse au début de la réaction, qui est la tangente $\Delta[P]/\Delta t$ à la courbe expérimentale ; dans cette phase, la réaction inverse est négligeable.

De telles études phénoménologiques de réactions mettant en jeu un ou plusieurs substrats apportent des informations fondamentales sur la spécificité et le mécanisme d'action des nombreux enzymes qui continuent à être isolés.

RELATIONS ENTRE LA VITESSE DE RÉACTION ET LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT OU DE L'ENZYME

Les relations entre la vitesse de réaction V_0 et la concentration de substrat [S] ou d'enzyme [E] sont aisément établies dans le cas d'une réaction mettant en jeu un seul substrat S qui se transforme en un seul produit P : S → P, dans des conditions expérimentales où la température *T* et la concentration des effecteurs permettent une activité élevée de l'enzyme sans dénaturation de ce dernier.

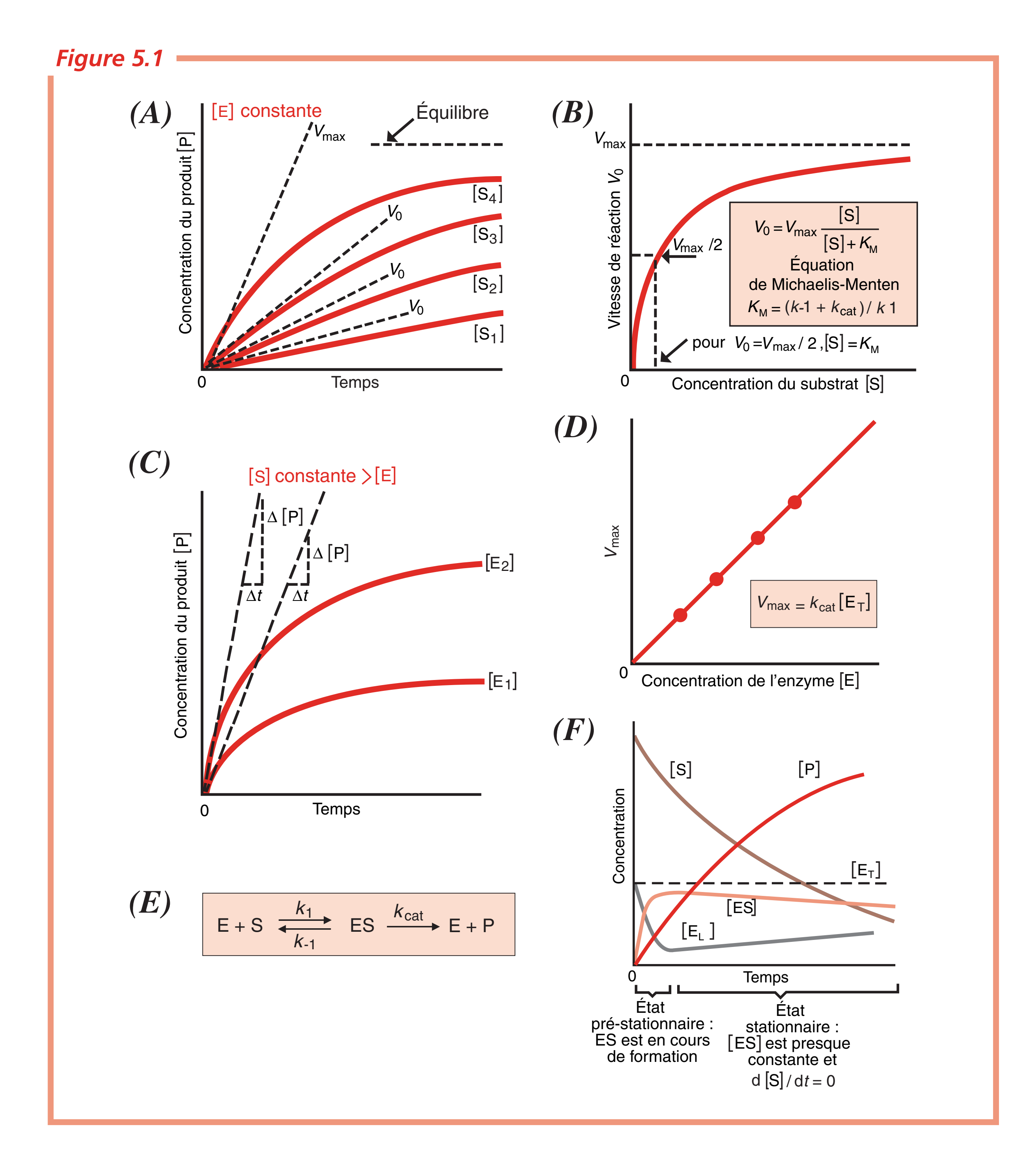
Pour une concentration constante d'enzyme [E], la concentration du produit [P] peut être mesurée en fonction du temps *t* pour des valeurs croissantes de la concentration du substrat [S]. Les résultats sont portés sur des courbes à partir de chacune desquelles on détermine V_0 (*Figure 5.1A*). La représentation de V_0 en fonction de [S] a une allure hyperbolique et tend asymptotiquement vers une limite dite vitesse maximale V_{max} atteinte pour une valeur de [S] dite saturante (*Figure 5.1B*). Ce phénomène de saturation est un caractère essentiel des réactions enzymatiques ; les réactions non catalysées par un enzyme ne présentent pas ce phénomène.

À [S] saturante, [P] peut être mesurée en fonction du temps *t* pour des [E] croissantes (*Figure 5.1C*). Les résultats sont, là aussi, portés sur des courbes à partir desquelles on détermine V_0. Plus forte est [E], plus rapide est la réaction et V_0 apparaît alors comme directement proportionnelle à [E] (*Figure 5.1D*). Cette relation linéaire entre V_0 et [E] permet de doser l'enzyme d'après son activité. L'unité est définie comme la quantité d'enzyme qui, dans des conditions expérimentales déterminées, donne une mole de produit par unité de temps.

THÉORIE DU COMPLEXE STÉRÉOSPÉCIFIQUE ET PROPRIÉTÉS CINÉTIQUES DES ENZYMES

La spécificité d'action des enzymes et les résultats des expériences de cinétique mettant en évidence les variations de V_0 en fonction de [S] ou de [E], conduisent à admettre que l'activité catalytique des enzymes est liée à la formation d'un complexe stéréospécifique transitoire enzyme-substrat ES (*Figure 5.1E*). Les constantes de vitesse k_1 et k_{-1} gouvernent les vitesses d'association de S et de E et de dissociation de S de ES, respectivement. La constante de vitesse de la seconde étape k_{cat}, la constante catalytique ou turnover de l'enzyme, détermine la vitesse de la réaction enzymatique.

Aux très faibles concentrations de substrat S, une fraction seulement des centres catalytiques de l'enzyme E est engagée dans la formation d'un complexe ES. Lorsque [S] croît, le nombre de centres catalytiques engagés dans la formation de ES croît selon une relation hyperbolique et V_0 augmente de même. Lorsque tous les centres catalytiques sont engagés, l'enzyme est saturé (*Figure 5.1F*) ; V_0 ne peut plus augmenter et atteint une valeur maximale V_{max}, ce qu'exprime l'asymptote de la *Figure 5.1B*. Enfin, lorsque le substrat est en concentration toujours saturante, V_0 ne peut être que proportionnelle à [ES], c'est-à-dire à [E] elle-même (*Figure 5.1D*).



L'analyse des propriétés cinétiques de nombre d'enzymes a conduit à l'équation de Michaelis-Menten (*Figure 5.1B*) qui relie V_0 à [S] et aux constantes de vitesse des étapes individuelles ; en effet, K_M, qui est une constante caractéristique de l'enzyme dite constante de Michaelis, est définie par le rapport $(k_{-1} + k_{cat})/k_1$. Remarquez que K_M, correspond à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse atteint la moitié de la vitesse maximale. La cinétique de la plupart des enzymes obéit de façon satisfaisante à cette loi ; il y a cependant des exceptions.

ÉQUATION DE MICHAELIS-MENTEN

Dans la phase initiale d'une réaction enzymatique S → P, où la réaction inverse P → S est négligeable, la formation catalytique de P avec régénération de E est une simple réaction du premier ordre où V_0 est à chaque instant proportionnelle à [ES] :

$$V_0 = k_{cat}[ES]$$

A priori, on ignore la valeur de la constante k_{cat}, ainsi que celle de [ES]. On est donc conduit à établir une expression de la vitesse en fonction de [S] où n'apparaissent ni k_{cat}, ni [ES]. Pour y parvenir, on considère que V_0 est une fraction de V_{max} et on s'appuie sur les considérations ci-après :

– à la concentration saturante de substrat, $V_0 = V_{max}$; de plus, tout l'enzyme est complexé et donc [ES] = [ET] si on désigne par [ET] la concentration de l'enzyme total ; par substitution dans l'équation précédente, on a :

$$V_{max} = k_{cat}[E_T]$$

– à une concentration quelconque de substrat, V_0, exprimée comme une fraction de V_{max}, est proportionnelle à la fraction d'enzyme complexé par le substrat :

$$V_0 / V_{max} = [ES]/[E_T] \quad \text{(équation de vitesse)}$$

Il faut alors trouver une expression de la fraction [ES]/[ET] en fonction des constantes d'association et de dissociation de ES. Ce dernier est continuellement formé par le processus k_1 et détruit par les processus k_{-1} et k_{cat}. La vitesse d'accumulation de ES est donc égale à la différence entre sa vitesse de formation k_1[EL][S] et sa vitesse de destruction $(k_{-1} + k_{cat})$[ES].

Donc,

$$d[ES]/dt = \underbrace{k_1[E_L][S]}_{\text{formation}} - \underbrace{(k_{-1}+k_{cat})[ES]}_{\text{destruction}}$$

Dans la phase initiale de la réaction, V_0 est constante, ce qui signifie que la réaction est dans un état stationnaire où [ES] est stable, sa destruction équilibrant sa formation (*Figure 5.1F*) et que donc d[ES]/dt = 0. Ainsi, k_1[EL][S] = $(k_{-1} + k_{cat})$[ES]. Dans ces conditions :

$$\frac{[E_L][S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1}+k_{cat})}{k_1} = K_M$$

où K_M, est une constante dite constante de Michaelis.

L'enzyme étant conservé au cours de la réaction, [EL] = [ET] – [ES]. En substituant cette valeur de [EL] dans l'équation précédente, on arrive à :

$$\left(\frac{[E_T]}{[ES]} - 1\right)[S] = K_M$$

Par substitution de la valeur de [ET]/[ES] tirée de l'équation de vitesse, on a :

$$\left(\frac{V_{max}}{V_0} - 1\right)[S] = K_M \quad \text{ou} \quad V_0 = V_{max}\frac{[S]}{[S]+K_M}$$

Cette équation, dite de Michaelis-Menten, exprime la vitesse de réaction V_0 en fonction de la concentration du substrat [S] selon une relation hyperbolique où figurent deux constantes, la vitesse V_{max} et la constante de Michaelis K_M. Lorsque $[S] = K_M$, $V_0 = V_{max}/2$, ce qui montre que la constante de Michaelis K_M correspond à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse atteint la moitié de la vitesse maximale.

DÉTERMINATION EXPÉRIMENTALE DES VALEURS DE V_{max} ET DE K_M

D'après l'équation de Michaelis-Menten, V_{max} et K_M apparaissent comme deux constantes caractéristiques d'un système enzymatique. Leur valeur peut être aisément déterminée par mesure des vitesses initiales pour une série de concentrations de substrat, à concentration fixe d'enzyme. Pour obtenir des valeurs précises, les concentrations de substrat doivent être largement étalées de part et d'autre de K_M afin de donner une hyperbole. Actuellement, des logiciels permettent d'analyser par ordinateur les résultats expérimentaux, de construire l'hyperbole et d'en tirer la valeur des constantes V_{max} et K_M. Cette dernière peut aussi être déterminée par des méthodes graphiques à partir de transformations de l'équation de Michaelis-Menten qui conduisent à des relations linéaires. Les plus couramment utilisées sont celles de Lineweaver-Burk et de Eadie-Hofstee.

En prenant la réciproque des deux membres de l'équation de Michaelis-Menten, on arrive à :

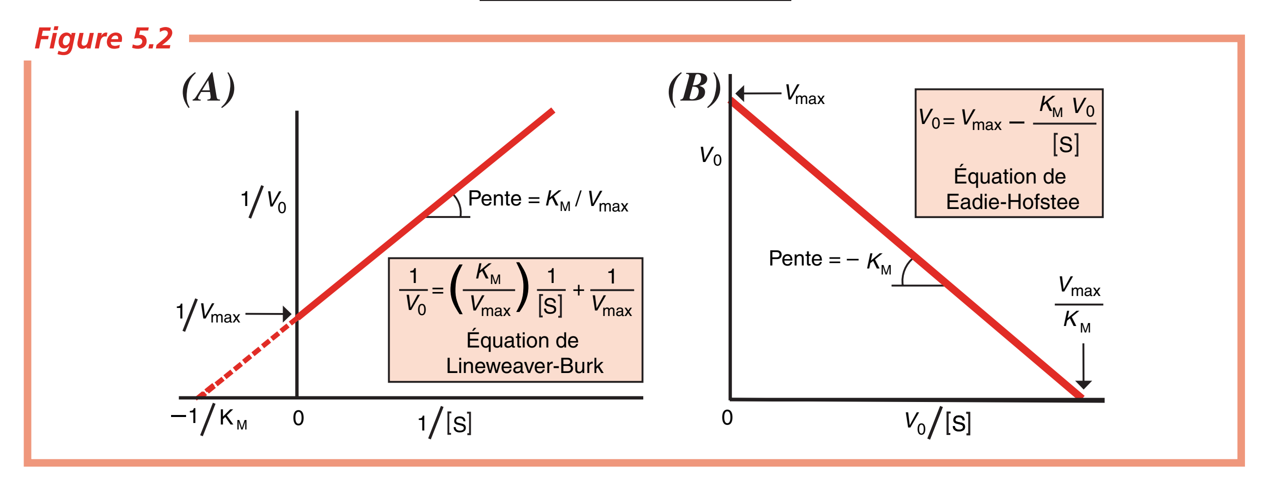
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \bullet \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Dans cette relation, dite de Lineweaver-Burk, $1/V_0$ est linéaire en $1/[S]$ (*Figure 5.2A*). L'intersection de la droite représentative avec l'abscisse détermine $-1/K_M$ et son intersection avec l'ordonnée $1/V_{max}$.

Une autre transformation de l'équation de Michaelis-Menten est celle de Eadie-Hofstee qui donne V_0 en fonction de $V_0/[S]$ (*Figure 5.2B*) ; elle est l'équivalent d'une courbe de Scatchard

$$V_0 = V_{max} - \frac{K_M\ V_0}{[S]}$$

Figure 5.2



SIGNIFICATION PHYSIQUE DE K_M

La constante de Michaelis K_M apparaît comme l'une des deux constantes qui caractérisent un enzyme. Il importe donc de préciser sa signification physique. $K_M = (k_{-1} + k_{cat})/k_1$ mais, *a priori*, on ignore les valeurs relatives de ces trois constantes.

Dans la majorité des systèmes enzymatiques, les vitesses de formation et de dissociation de ES sont grandes par rapport à celle de sa conversion en P. Lorsqu'il en est ainsi, k_{cat} est négligeable par rapport à k_{-1} et K_M représente une constante d'équilibre ; il est équivalent à la constante de dissociation K_d de ES : $K_M = k_{-1}/k_1 = K_d$; K_M est alors une mesure de la force de liaison du complexe et donc de l'affinité du substrat pour l'enzyme. Un K_M faible signifie que k_1 est plus grand que k_{-1} et que le substrat se lie fortement à l'enzyme pour lequel il a une forte affinité. Dans d'autres systèmes, comme ceux de la catalase ou de la peroxydase par exemple, où il s'est avéré que k_{cat} était grand par rapport à k_{-1}, on a $K_M = k_{cat}/k_1$. La constante de Michaelis ne correspond plus à la constante de dissociation du complexe. La signification de K_M est donc complexe. Les valeurs des K_M sont très différentes selon les enzymes ; pour nombre d'entre eux, elles se situent entre 10^{-1} et 10^{-7} M (*Tableau 5.1*).

SIGNIFICATION PHYSIQUE DE LA CONSTANTE CATALYTIQUE K_{cat}

D'après la théorie du complexe stéréospécifique, $V_{max} = k_{cat}[ET]$, si on désigne par [ET] la concentration de l'enzyme total ; la constante de vitesse k_{cat}, ou constante catalytique, est alors le nombre de molécules de substrat converties en produit par molécule d'enzyme et par unité de temps, habituellement la seconde, dans des conditions expérimentales données, lorsque l'enzyme est totalement saturé par le substrat (*Figure 5.3*) ; pour cette raison, k_{cat} est aussi dénommé nombre de turnover ou turnover. La constante catalytique k_{cat} est donc une mesure directe de l'activité catalytique d'un enzyme : plus grand est k_{cat}, plus rapides sont les événements catalytiques au sein du complexe enzyme-substrat. La constante catalytique k_{cat} s'exprime en s^{-1} et son inverse a la dimension d'un temps : c'est le temps requis par une molécule d'enzyme pour transformer une molécule de substrat. La constante catalytique de la plupart des enzymes se situe entre 10^2 et 10^4 s^{-1}.

LE CRITÈRE K_{cat}/K_M MESURE LA SPÉCIFICITÉ ET L'EFFICACITÉ DES ENZYMES

Les deux constantes K_M et k_{cat} reflètent donc les propriétés catalytiques d'un enzyme. Des informations supplémentaires sur leur signification peuvent être obtenues en considérant l'évolution d'une réaction enzymatique à faible concentration de substrat. Si l'on remplace V_{max} par sa valeur définie ci dessus, l'équation de Michaelis s'écrit :

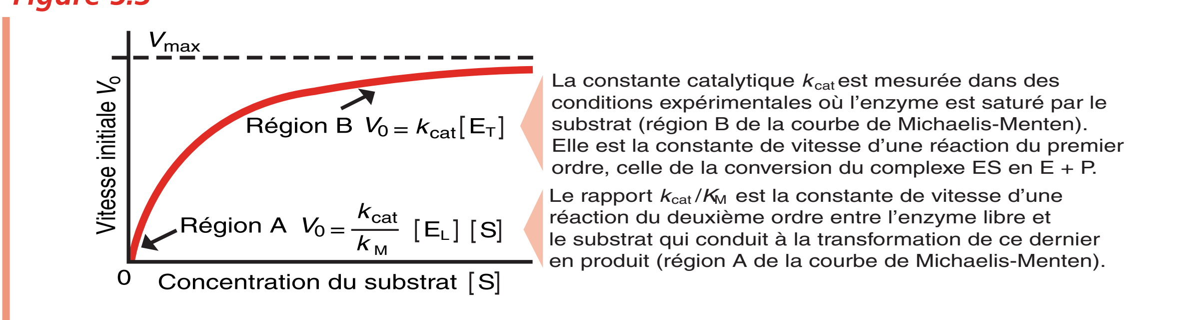
$$V_0 = k_{cat}[E_T]\frac{[S]}{[S]+K_M}$$

Tableau 5.1

Enzymes pour lesquels k_{cat}/K_M est proche de la limite controlée par la vitesse de diffusion (10^8 à 10^9 $M^{-1}S^{-1}$)

Enzyme	Substrat	k_{cat} (s^{-1})	K_M (M)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
Acétylcholine estérase	Acétylcholine	$1,4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1,6 \times 10^8$
Anhydrase carbonique	CO_2	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
	HCO_3^-	4×10^5	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^7$
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1,1	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	$5,7 \times 10^3$	2×10^{-5}	$2,8 \times 10^8$
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	$1,6 \times 10^8$
	Malate	9×10^2	$2,5 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^7$
Triose phosphate isomérase	Glycéraldéhyde 3-phosphate	$4,3 \times 10^3$	$4,7 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^8$

Figure 5.3



À faible concentration de substrat, $[S] << K_M$, la plupart des molécules d'enzyme sont libres et donc [ET] et [EL] sont très peu différentes. Cette équation devient :

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M}[E_L][S]$$

où (k_{cat}/K_M) apparaît comme la constante de vitesse d'une réaction du deuxième ordre entre le substrat et l'enzyme libre (*Figure 5.3*) et donne une mesure directe des deux caractéristiques de la catalyse enzymatique, la spécificité et l'efficacité.

La spécificité d'un enzyme vis-à-vis de deux substrats A et B, présents à des concentrations égales, peut être appréciée par le rapport :

$$\frac{V_A}{V_B} = \frac{(k_{cat}/K_M)_A[E][A]}{(k_{cat}/K_M)_B[E][B]} = \frac{(k_{cat}/K_M)_A}{(k_{cat}/K_M)_B}$$

et pour cette raison k_{cat}/K_M est appelé constante de spécificité.

Par ailleurs, dans le cas où $k_{cat} >> k_{-1}$, $K_M = k_{cat}/k_1$ et $k_{cat}/K_M = k_1$. La valeur limite de (k_{cat}/K_M) est fixée par k_1, qui est la vitesse de formation de ES. L'efficacité de l'enzyme ne dépend alors que de la vitesse de fixation du substrat sur l'enzyme, elle-même contrôlée par la vitesse de diffusion. Ainsi, k_1, et donc (k_{cat}/K_M), ne peuvent être supérieurs à une valeur comprise entre 10^8 et 10^9 M^{-1} s^{-1}. Précisément, la valeur du (k_{cat}/K_M) de certains enzymes, tels que l'acétylcholine estérase, l'anhydrase carbonique et la triosephosphate isomérase, est comprise entre 10^8 et 10^9 M^{-1} s^{-1}, ce qui montre que ces enzymes ont atteint la perfection cinétique (*Tableau 5.1*).

Dans la cellule, les enzymes d'une voie métabolique sont souvent associés en complexes multienzymatiques au sein desquels le produit d'un enzyme est très rapidement rencontré par l'enzyme suivant de la voie. Ainsi, la limite imposée par la vitesse de diffusion en solution peut être partiellement contournée par le confinement des substrats et des produits dans le volume limité d'un complexe multienzymatique.

RÉACTIONS METTANT EN PRÉSENCE PLUSIEURS SUBSTRATS

Dans la cellule, les réactions qui mettent en jeu un seul substrat sont peu nombreuses. En fait, la plupart des réactions biochimiques catalysées par un enzyme mettent en œuvre deux ou même, dans un certain nombre de cas, plusieurs substrats, ce qui conduit à l'apparition de plusieurs produits. Dans de telles réactions, l'ordre des étapes est un aspect important du mécanisme catalytique et plusieurs types de séquences ont été invoqués pour décrire les réactions faisant intervenir plusieurs substrats. Ainsi, dans une réaction à deux substrats, S1 et S2, donnant deux produits P1 et P2, la liaison des substrats peut se faire selon un mécanisme séquentiel ; les deux substrats doivent se fixer sur l'enzyme et former un complexe ternaire avant que les produits ne soient libérés. Dans certaines réactions, la liaison des substrats s'effectue selon un mécanisme séquentiel ordonné, l'un des substrats devant impérativement se fixer en premier comme, par exemple, dans l'oxydation de certains substrats par des déshydrogénases à NAD^+ (*Figure 5.4A*). Dans d'autres réactions, la liaison peut se faire au hasard, l'un ou l'autre substrat se fixant le premier comme, par exemple, dans la phosphorylation de la créatine par l'ATP avec formation de phosphocréatine et d'ADP (*Figure 5.4B*).

La liaison des substrats peut aussi se faire selon un mécanisme de double déplacement, dit Ping-Pong ; un premier substrat se fixe et un premier produit est libéré, puis un second substrat se lie et un second produit est formé. Dans ce cas, il apparaît un intermédiaire constitué d'une forme modifiée de l'enzyme qui souvent porte un fragment du premier substrat. Ce mécanisme est rencontré dans le transfert d'un groupe amine entre un aminoacide et un acide α-cétonique (*Figure 5.4C*), l'oxydation de certains substrats par des déshydrogénases à FAD et dans les réactions faisant appel à une catalyse covalente, comme, par exemple, les réactions d'hydrolyse des chaînes polypeptidiques par les sérine protéases.

La théorie cinétique développée dans les paragraphes précédents est applicable à l'analyse de ces réactions complexes et à la détermination des constantes de vitesse de leurs différentes étapes, à condition de procéder en faisant varier la concentration d'un substrat tout en laissant constante celle de l'autre substrat (*Figure 5.4D*).

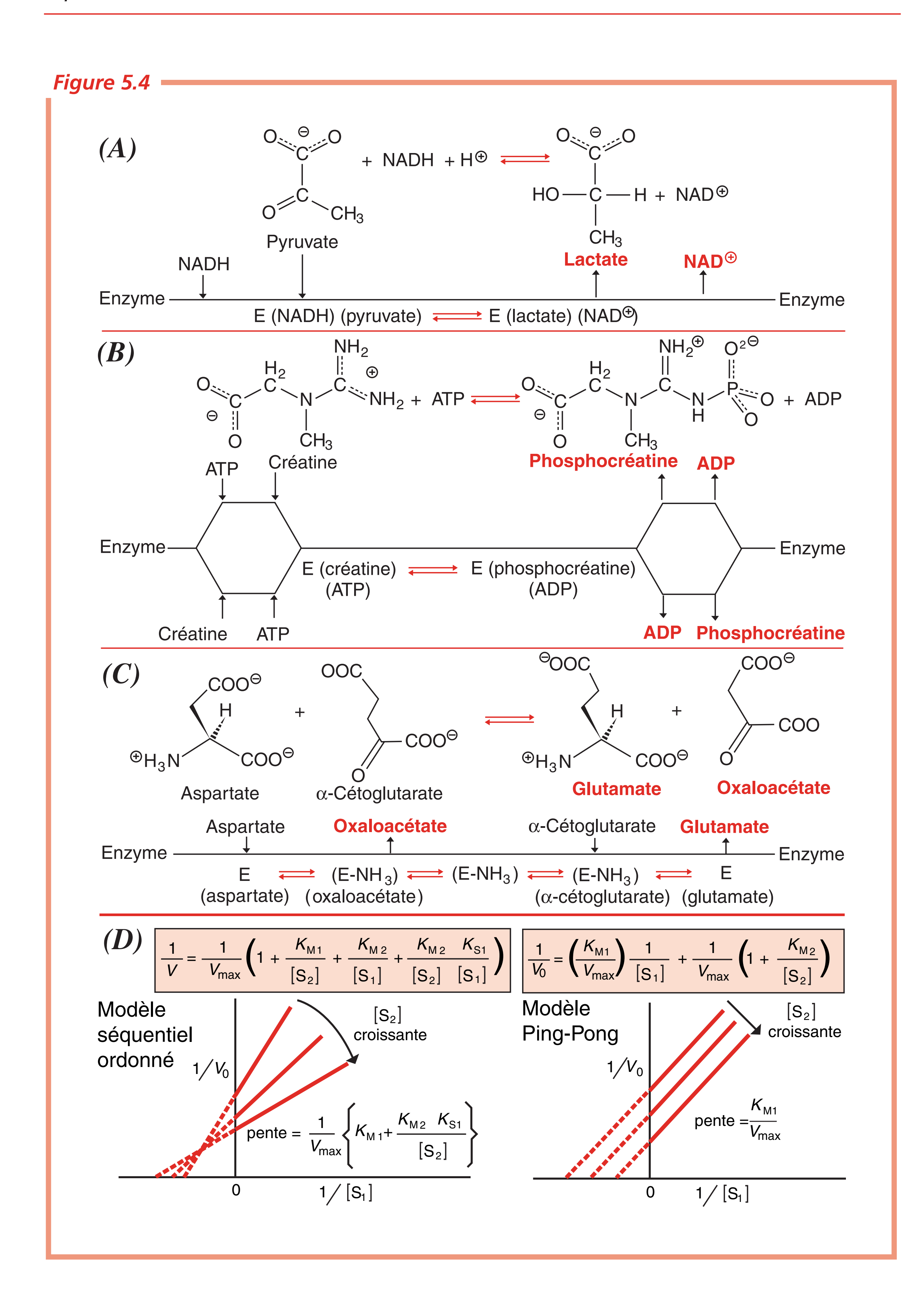


Figure 5.4
(A)
+ NADH + H⊕
HO — C — H + NAD⊕
CH_3
Pyruvate
Lactate
NADH
NAD⊕
Enzyme
E (NADH) (pyruvate) ⇌ E (lactate) (NAD⊕)
Enzyme
(B)
+ ATP ⇌
+ ADP
Créatine
Phosphocréatine
ATP
ADP
Enzyme
E (créatine) (ATP) ⇌ E (phosphocréatine) (ADP)
Enzyme
Créatine
ATP
ADP
Phosphocréatine
(C)
Aspartate
α-Cétoglutarate
Glutamate
Oxaloacétate
Aspartate
Oxaloacétate
α-Cétoglutarate
Glutamate
Enzyme
E (aspartate) ⇌ (E-NH_3) (oxaloacétate) ⇌ (E-NH_3) ⇌ (E-NH_3) (α-cétoglutarate) ⇌ E (glutamate)
Enzyme
(D)
$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_{M1}}{[S_2]} + \frac{K_{M2}}{[S_1]} + \frac{K_{M2}}{[S_2]}\frac{K_{S1}}{[S_1]}\right)$
$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_{M1}}{V_{max}}\right)\frac{1}{[S_1]} + \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_{M2}}{[S_2]}\right)$
Modèle séquentiel ordonné
$1/V_0$
$[S_2]$ croissante
pente = $\frac{1}{V_{max}}\left\{K_{M1} + \frac{K_{M2}\ K_{S1}}{[S_2]}\right\}$
0
$1/[S_1]$
Modèle Ping-Pong
$1/V_0$
$[S_2]$ croissante
pente = $\frac{K_{M1}}{V_{max}}$
0
$1/[S_1]$

EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LES RÉACTIONS ENZYMATIQUES

La vitesse des réactions chimiques est fonction de la température. Mais, alors que les réactions ioniques se produisent à de très grandes vitesses, même à basse température, les réactions organiques ne s'effectuent à une vitesse appréciable qu'à température moyenne ou élevée. S'il n'en était pas ainsi d'ailleurs, les édifices moléculaires complexes qui constituent les êtres vivants n'auraient aucune stabilité et la vie, telle que nous la connaissons, n'existerait pas. L'étude des effets de la température sur les réactions enzymatiques a permis d'éclairer certains aspects des phénomènes de catalyse enzymatique. Cependant, toute variation de température peut agir sur un système enzymatique par deux effets indépendants qui doivent être considérés séparément : l'action sur les constantes cinétiques de la réaction et l'action dénaturante sur la protéine enzymatique entraînant son inactivation.

Relation entre la vitesse des réactions enzymatiques et la température

Pour une réaction non enzymatique, la variation de la constante de vitesse k avec la température a été établie expérimentalement par Arrhénius :

$$k = A_e{}^{-E/RT}$$

où A est une constante, E l'énergie d'activation expérimentale, R la constante des gaz et T la température absolue. Cette relation exprime que la vitesse d'une réaction dépend du nombre de molécules activées, c'est-à-dire qui possèdent une certaine énergie supplémentaire E, dite énergie d'activation.

L'équation précédente s'utilise plus commodément sous sa forme logarithmique :

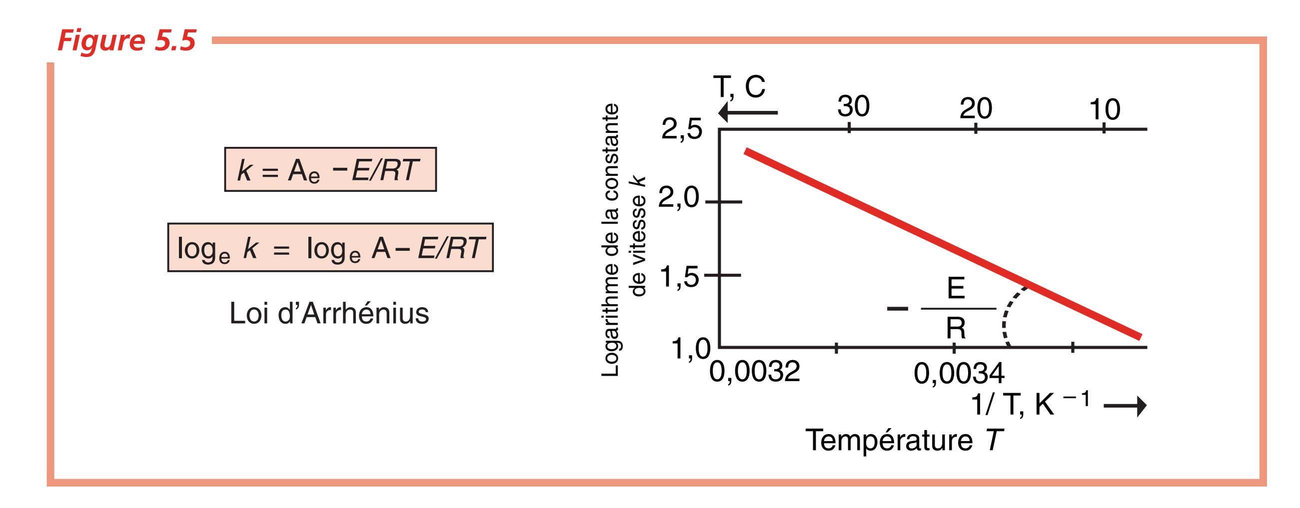
$$\log_e k = \log_e A - E/RT$$

En portant $\log_e k$ en fonction de $1/T$, on obtient une droite de pente $-E/R$, ce qui permet de déterminer E (*Figure 5.5*).

Pour les réactions enzymatiques, on ne peut explorer qu'un domaine restreint de températures absolues qui s'étend généralement de 273 °K (0 °C) à 333 °K (60 °C). Au-delà, la dénaturation thermique intervient et il n'est plus possible d'effectuer des mesures valables. Dans cet intervalle de température, les réactions enzymatiques obéissent en général de façon très satisfaisante à cette relation et la vitesse des réactions enzymatiques, comme celle des autres réactions chimiques, s'accroît avec la température. Cependant, dans une réaction enzymatique, la représentation graphique de $\log_e k$ en fonction de $1/T$ ne donne pas toujours une simple droite. On observe souvent une discontinuité de pente qui correspond à deux droites se rencontrant en un point, ce qui indique un changement dans l'énergie d'activation, et donc dans le mécanisme d'action enzymatique.

Signification physique de A et de E

Les molécules sont des structures stables. Le passage d'une structure stable initiale à une structure stable différente implique l'existence fugace d'une série de structures intermédiaires, dites complexes de transition ou complexes activés, qui sont instables et tendent



donc à retourner très rapidement à l'un des états stables. Dans la succession des états de transition instables, l'un est particulièrement intéressant, c'est celui dont la structure est telle qu'il a des chances égales de retourner à l'état initial ou d'évoluer vers l'état final.

Suivant la théorie cinétique, pour qu'il y ait réaction, il faut que les molécules entrent en collision suivant une orientation définie ; seul un petit nombre de collisions se font dans ces conditions. De plus, les rencontres ne sont efficaces que si les molécules possèdent une énergie cinétique suffisante, dite énergie libre d'activation de Gibbs $\Delta G^\ddagger$; dans une solution, où toutes les molécules ne sont pas dans le même état énergétique, seul un petit nombre de collisions se font avec une énergie suffisante. En effet, les molécules activées $[S^\ddagger]$ possédant cette énergie d'activation ne représentent, à un instant déterminé, qu'une très petite fraction de la concentration totale $[S^\circ]$ donnée par la relation :

$$[S^\ddagger] = [S^\circ]\, e^{-\Delta H^\ddagger / RT}$$

Étant donné que seules les molécules ayant atteint l'état de transition ont des chances égales de retourner à l'état initial ou d'évoluer vers l'état final, la constante de vitesse d'une réaction chimique doit être proportionnelle à la population de l'état de transition :

$$k = Q\, e^{-\Delta H^\ddagger / RT}$$

où $Q = k_B T/h$, k_B étant la constante de Boltzmann et h la constante de Plank.

Étant donné que $\Delta H^\ddagger = \Delta G^\ddagger + T\Delta S^\ddagger$, où $\Delta H^\ddagger$ représente la variation d'enthalpie activée, $\Delta S^\ddagger$ la variation d'entropie activée et T la température absolue, la relation précédente peut donc s'écrire :

$$k = Q e^{-\Delta S^\ddagger / R} \cdot e^{-\Delta H^\ddagger / RT}$$

La comparaison de cette équation et de celle d'Arrhénius montre que :

$$A = Q e^{-\Delta S^\ddagger / R} \quad \text{et} \quad E = \Delta H^\ddagger$$

Dans l'équation d'Arrhénius, la constante A contient donc un terme d'entropie activée et l'énergie d'activation expérimentale E correspond à la variation d'enthalpie activée de la réaction.

LES ENZYMES DIMINUENT L'ÉNERGIE D'ACTIVATION

Dans le cas simple d'un seul complexe ES, il apparaît un complexe activé $ES^{\ddagger}$ et la suite des événements réactionnels peut s'écrire :

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons ES^{\ddagger} \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$$

où ES et EP sont suffisamment stables par rapport à $ES^{\ddagger}$ pour être considérés comme des édifices moléculaires (*Figure 5.6A*). La mesure de k à différentes températures montre que l'énergie d'activation est plus faible pour une réaction catalysée par un enzyme que pour la même réaction effectuée en l'absence d'enzyme. La présence de l'enzyme entraîne donc une diminution de l'énergie d'activation nécessaire pour atteindre l'état de transition. Il apparaît alors que l'accroissement de vitesse de réaction à température physiologique, qui est l'essence même du phénomène de catalyse, est dû à un abaissement de la barrière énergétique, ou barrière de potentiel, qui sépare les éléments initiaux et finals d'une réaction. Cet abaissement résulte du fait que l'enzyme offre à la réaction une voie différente de celle que doit emprunter la réaction en l'absence d'enzyme, et par conséquent des états de transition différents.

Dans une réaction enzymatique constituée par la série d'équilibres entre des complexes ES et un complexe EP, un état de transition intervient dans le passage d'un complexe ES au suivant et du dernier complexe ES au complexe EP :

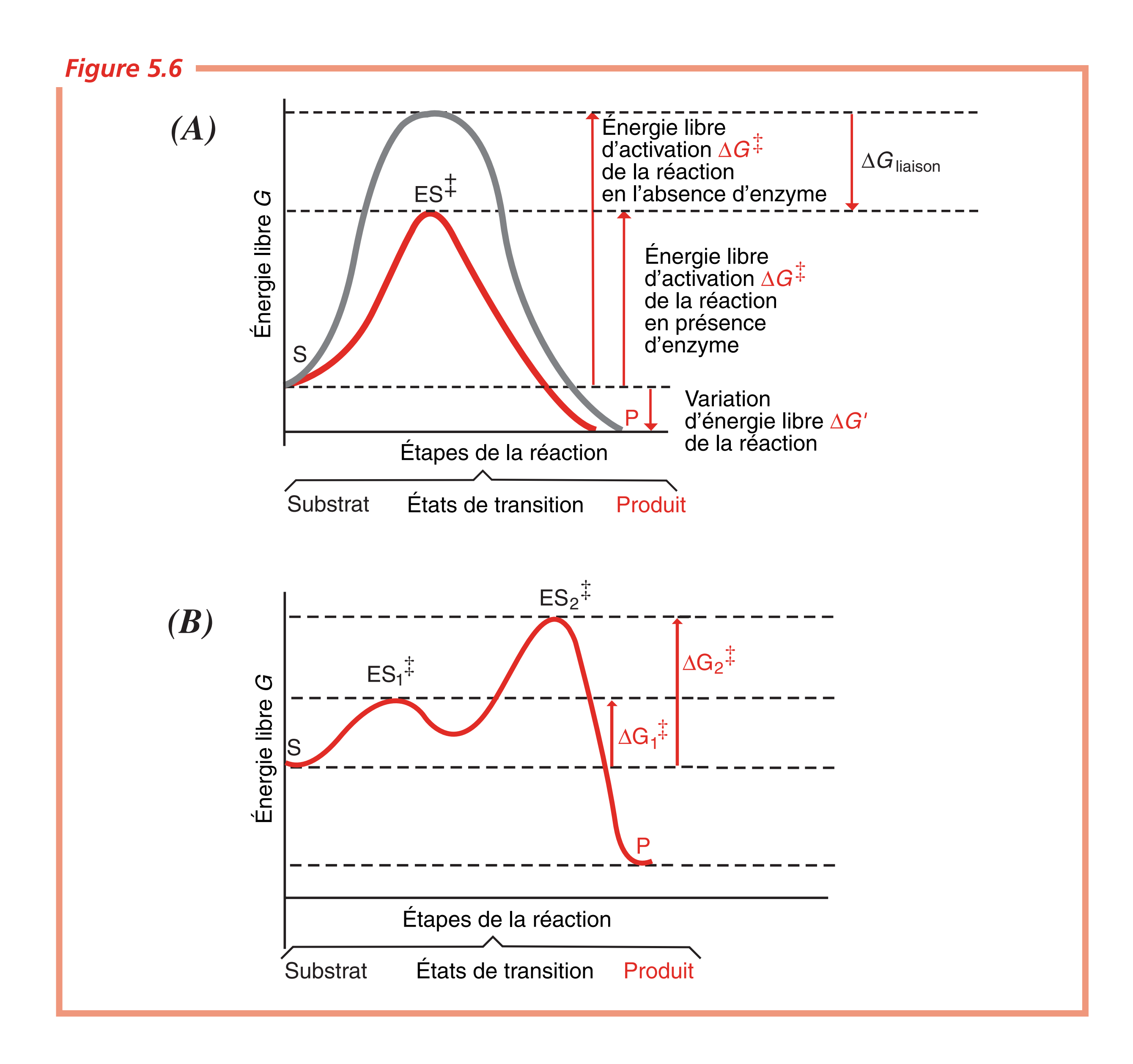
$$E + S \rightleftharpoons ES_1^{\ddagger} \rightleftharpoons ES_1 \rightleftharpoons ES_2^{\ddagger} \rightleftharpoons ES_2 \rightleftharpoons EP^{\ddagger} \rightleftharpoons E + P$$

La structure de chaque intermédiaire étant relativement proche de celle du précédent et du suivant, la barrière de potentiel associée à chaque transition est plus basse que celle qui serait requise si la réaction avait lieu en une seule étape (*Figure 5.6B*). Seule compte, pour l'énergie de la réaction globale, la barrière de potentiel associée à la transition dont le potentiel est le plus élevé. Cette généralisation vaut non seulement pour les réactions enzymatiques considérées individuellement, mais plus encore pour les systèmes de réactions successives du métabolisme.

NATURE DU POUVOIR CATALYTIQUE ET DE LA SPÉCIFICITÉ DES ENZYMES

Pour abaisser l'énergie d'activation $\Delta G^{\ddagger}$ d'une réaction, un système enzymatique doit acquérir une quantité d'énergie équivalente à celle dont est diminuée $\Delta G^{\ddagger}$ (*Figure 5.6A*). L'essentiel de cette énergie vient de l'énergie de liaison $\Delta G_{\text{liaison}}$ libérée par la formation de multiples liaisons de faible énergie entre l'enzyme et le substrat lors de l'état de transition. Ces interactions de faible énergie sont optimisées dans l'état de transition ; les enzymes sont complémentaires, non pas des substrats eux-mêmes, mais des états de transition par lesquels passent ces substrats lorsqu'ils sont convertis en produits lors de la réaction enzymatique.

Figure 5.6



Ainsi, les interactions de faible énergie entre l'enzyme et les substrats constituent la force qui assure le pouvoir catalytique et la spécificité des enzymes.

INACTIVATION THERMIQUE DES ENZYMES

L'agitation thermique, comme de nombreux autres agents physiques, provoque la rupture des liaisons de faible énergie : liaisons hydrogène, interactions hydrophobes ou électrostatiques, forces de van der Walls, qui maintiennent les structures secondaires, tertiaires ou quaternaires des protéines. La dénaturation thermique des enzymes entraîne leur inactivation, en général de façon irréversible. La dénaturation provoque des changements de forme de la protéine qui peut passer d'une forme globulaire à une forme allongée et devenir insoluble. La dénaturation obéit à la loi d'Arrhénius, mais sa vitesse ne devient mesurable qu'au-delà d'une certaine température critique.

Chapitre 6

Stratégies moléculaires de la catalyse enzymatique

Nombre d'enzymes sont des protéines douées par elles-mêmes d'une activité catalytique. En effet, la complexité de la structure des protéines globulaires et la diversité des chaînes latérales de leurs résidus aminoacide permettent la formation de très nombreux types de sites catalytiques. Cependant, lorsque les réactivités des chaînes latérales sont insuffisantes, les enzymes requièrent l'aide de certaines molécules non polypeptidiques. Ainsi, certains enzymes sont des protéines, dites apoenzymes, qui ne sont fonctionnelles qu'associées à un cofacteur qui est un composé organique, le plus souvent de faible poids moléculaire, dit coenzyme. L'activité catalytique spécifique appartient à l'apoenzyme, donc à la composante protéique, mais le cofacteur organique est une partie essentielle du site actif. De plus, la plupart des enzymes requièrent la présence d'un ion métallique pour être actifs.

Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord le concept de site actif, ou centre catalytique, d'un enzyme puis les principaux mécanismes de catalyse enzymatique par effet chimique : catalyse acide-base, catalyse covalente, ou par effet de liaison : proximité, stabilisation de l'état de transition. Nous illustrerons ensuite ces mécanismes par la description de quelques protéines enzymatiques dont la structure tridimensionnelle est connue et la stratégie catalytique établie au niveau moléculaire. Nous poursuivrons par une étude du mécanisme d'action de quelques coenzymes impliqués dans des réactions fondamentales du métabolisme. Nous terminerons par une présentation du rôle de certains cofacteurs métalliques.

LE MODÈLE SERRURE-CLÉ ET L'ADAPTATION INDUITE

Les premières études sur les enzymes ont montré leur extrême stéréospécificité, un enzyme ne catalysant qu'un seul type de réaction et même n'agissant que sur un seul substrat. Les études cinétiques ont conduit au concept du complexe transitoire enzyme-substrat ES évoluant vers la formation d'un produit P et la libération de l'enzyme S inchangé à la fin de la réaction. Pour expliquer la stéréospécificité des enzymes, Emil Fischer a proposé, dès 1894, le modèle serrure-clé (*Figure 6.1A*). Ce modèle implique que l'enzyme ne se lie à un substrat qu'au niveau d'un seul site, dit site actif, et que ce dernier n'accepte qu'un substrat spécifique, comme une serrure qui ne peut fonctionner qu'avec sa propre clé. Si le modèle de Fischer donne une interprétation claire de la spécificité enzymatique, il ne contribue en rien à la compréhension du mécanisme catalytique en lui-même. En 1958, il a été repris et complété par Daniel E. Koshland, Jr, qui s'appuyait alors sur des études cinétiques de la phosphorylation du glucose par l'hexokinase (*Figure 6.1B*). Pour s'unir étroitement, le site actif et son substrat doivent tous deux modifier quelque peu leur forme pour adopter des conformations complémentaires, celle du substrat s'approchant alors de la structure de l'état de transition (*Figure 6.1B*). Ainsi, dans le modèle de Fischer revu par Koshland, ce n'est plus le substrat, mais l'état de transition qui est la clé. Ce phénomène dynamique, mettant à profit la flexibilité des protéines enzymatiques, a été proposé sous le nom d'adaptation induite.

Par la suite, la détermination de la structure tridimensionnelle de l'hexokinase par cristallographie de rayons X (*Figure 6.1C*) a permis de montrer que cet enzyme existe effectivement sous deux conformations : une forme ouverte en l'absence de glucose et une forme fermée après fixation du glucose dans le site actif.

Les forces de liaison responsables de la formation du complexe ES et de la stabilisation de l'état de transition $ES^‡$ sont de nature non covalente : forces électrostatiques, liaisons hydrogène, interactions hydrophobes et forces de van der Walls. Des forces électrostatiques peuvent s'établir entre le substrat et des résidus aminoacide ionisables de l'enzyme (aspartate, glutamate, lysine, arginine, histidine). Selon la loi de Coulomb, elles sont plus intenses dans l'environnement essentiellement non polaire du site actif, où la constante diélectrique ε est faible, que dans l'eau, où elle est environ 80 fois plus forte. Des liaisons hydrogène peuvent se créer entre le substrat et de nombreux résidus aminoacide de l'enzyme : résidus ionisables déjà mentionnés, résidus polaires non ionisables (asparagine, glutamine, sérine, thréonine, cystéine), certains résidus hydrophobes (tyrosine, tryptophane, méthionine). Ce sont les interactions les plus fortes après les forces électrostatiques ; elles sont donc assez stables, mais cependant suffisamment faibles pour que les réactifs puissent se dissocier facilement. Des interactions hydrophobes peuvent s'établir entre des groupes non polaires du substrat et des régions hydrophobes du site actif de l'enzyme. Enfin, des forces de van der Walls entre le substrat et des résidus aminoacide hydrophobes, bien que faibles, peuvent contribuer par leur nombre à la stabilisation des complexes ES et $ES^‡$.

Figure 6.1

(A) Serrrure-clé

Substrat

Site actif
ou
centre catalytique

Enzyme

(B) Adaptation induite

Substrat

+

Enzyme

Substrat
dans
la conformation
de l'état
de transition

Site actif
ou
centre catalytique

Enzyme

CH_2O

O

OH

HO

OH

OH

Glucose

+ ATP

Hexokinase

$CH_2OPO_3^{2-}$

O

OH

HO

OH

OH

+ ADP + H+

Glucose 6-phosphate (G-6P)

(C)

Hexokinase

+ Glucose

Glucose

Conformation des deux lobes :
— en noir,
en l'absence de glucose
— en rouge,
après fixation du glucose

DES RÉSIDUS AMINOACIDE POLAIRES FORMENT LE CENTRE CATALYTIQUE DES ENZYMES

Des études structurales ont montré qu'effectivement les protéines enzymatiques ont en leur sein un site actif, en forme de cavité ou de crevasse, délimité par des résidus aminoacide hydrophobes ou polaires non ionisables, mais où sont aussi présents des résidus aminoacide polaires ionisables (*Tableau 6.1*) et parfois quelques molécules d'eau. Les résidus hydrophobes font du site actif un espace essentiellement hydrophobe et de faible constante diélectrique, où donc les interactions électrostatiques pourront être fortes. Les résidus polaires forment le centre catalytique de l'enzyme car c'est à leur niveau que s'effectuent entre l'enzyme et le substrat les interactions ou les réactions qui constituent l'essence même du mécanisme catalytique. Ainsi, à pH neutre, l'aspartate et le glutamate sont chargés négativement ; la lysine et l'arginine le sont positivement. Ces anions et ces cations peuvent alors participer à de fortes interactions électrostatiques avec des groupes de charge opposée appartenant au substrat. L'aspartate, le glutamate, et parfois la lysine, peuvent aussi intervenir dans le transfert de protons. L'histidine, dont la valeur du pK_a au sein des protéines est comprise entre 6 et 7, joue souvent le rôle d'accepteur ou de donneur de proton. Les résidus sérine et cystéine ont une réactivité qui leur permet de se lier par covalence à des groupes acyle et de les transférer d'un substrat à un autre.

LA VITESSE DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES EST AFFECTÉE PAR LE pH

L'activité de tous les enzymes varie en fonction de la concentration en ion H^+ (*Figure 6.2*). Elle présente en général un maximum pour un certain pH, dans des conditions déterminées. La plupart des enzymes présente un maximum d'activité entre pH 6 et 8. Certains cependant requièrent des conditions sensiblement plus acides ou plus alcalines (*Tableau 6.2*). La présence de résidus aminoacide ionisables dans la structure du site actif explique l'influence du pH sur la vitesse des réactions enzymatiques. En effet, l'état d'ionisation des groupes dissociables intervenant dans la formation et l'activité du complexe enzyme-substrat ES est fonction du pH. De plus, la dissociation d'un ou de plusieurs autres groupes du substrat ou de la protéine enzymatique peut aussi avoir une influence. Enfin, beaucoup de réactions enzymatiques comportent l'apparition de nouveaux groupes ionisables comme, par exemple, lors de la phosphorylation du glucose par l'ATP ou de l'hydrolyse d'un ester ; l'équilibre de telles réactions peut alors dépendre du pH.

Si l'activité était liée à l'état d'ionisation d'un seul groupe, la courbe représentative ne présenterait pas un maximum mais tendrait vers une asymptote. L'existence d'un pH optimal suggère donc qu'au moins deux groupes ionisables, avec des pK_a différents, soient impliqués et que la forme active du complexe enzyme-substrat soit telle qu'un de ces groupes soit associé, l'autre dissocié. Schématiquement, en considérant uniquement deux groupes, un carboxyle et un groupe amine par exemple, trois états sont possibles, selon le pH :

NH_3^+–Enzyme–COOH à pH acide	NH_3^+–Enzyme–COO^- à pH neutre	NH_2–Enzyme–COO^- à pH alcalin

Si la forme intermédiaire est la seule active, ou la plus active, la vitesse de réaction sera maximale aux environs de la neutralité.

Tableau 6.1

Résidu aminoacide	Groupe réactif	Charge à pH 7	Fonction
Sérine	$-CH_2OH$	0	Liaison covalente d'acyles
Tyrosine	$-OH$	0	Liaison hydrogène avec les ligands
Cystéine	$-S^-$	0	Liaison covalente d'acyles
Aspartate	$-COO^-$	−1	Liaison de cations ; transfert de protons
Glutamate	COO^-	−1	Liaison de cations ; transfert de protons
Lysine	$-NH_3^+$	+1	Liaison d'anions
Arginine	Guanidinium	+1	Liaison d'anions
Histidine	Imidazole	0	Transfert de protons

Figure 6.2

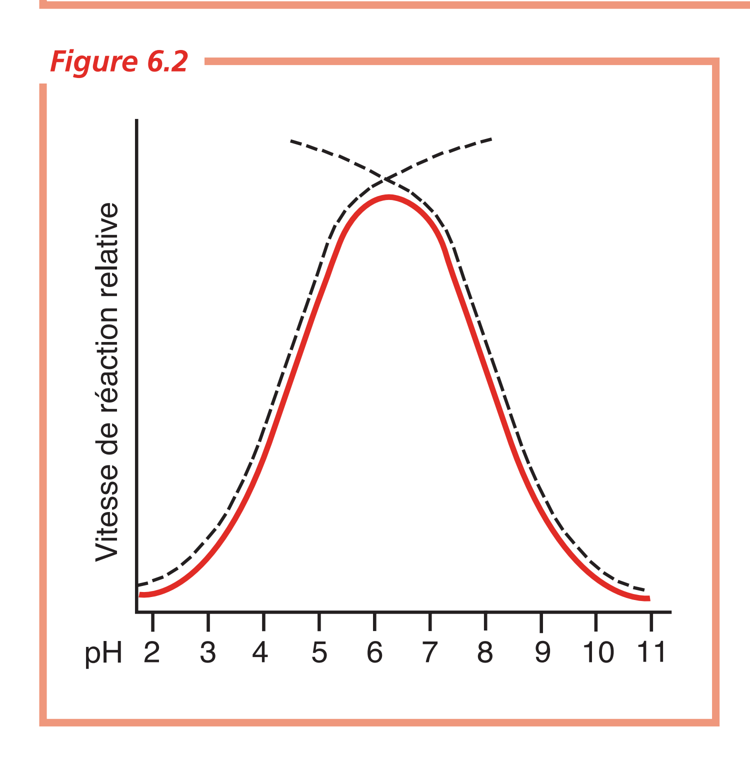


Tableau 6.2

pH optimal de quelques enzymes

Enzyme	pH optimal
Pepsine	2
Lysozyme	5
Phosphatase acide	5
Cholinestérase	de 7 à7,5
Chymotrypsine	8
Papaïne	de 4 à 8
Phosphatase alcaline	9
Arginase	10

Les deux constantes cinétiques K_M et V_{max} peuvent varier en fonction du pH. S'il n'y a pas d'effet sur K_M, mais seulement sur V_{max}, les groupes ionisables concernés participent à l'activation, mais ne contribuent pas à la formation ou à la stabilité du complexe ES. Lorsqu'il y a un effet sur K_M aussi bien que sur V_{max}, ce qui est le cas le plus général, l'interprétation devient plus complexe.

LA CATALYSE ACIDE-BASE

Presque toutes les réactions enzymatiques font intervenir, au moins dans l'une de leurs étapes, un mécanisme de catalyse acide-base où l'accélération de la réaction est réalisée grâce au transfert catalytique d'un proton. Ainsi, un accepteur de proton B peut cliver une liaison C-H en captant un proton et en formant le carbanion correspondant (*Figure 6.3A*).

Un accepteur de proton B peut aussi cliver d'autres liaisons impliquant un atome de carbone, par exemple une liaison C-N, en créant l'équivalent de OH^- par captation d'un proton d'une molécule d'eau (*Figure 6.3B*). Inversement, un donneur de proton BH^+ peut céder un proton lorsque la réaction s'effectue dans le sens inverse.

Les enzymes utilisent les chaînes latérales de leur centre catalytique pour accepter ou donner un proton ; le centre catalytique est alors l'équivalent biologique, à un pH voisin de la neutralité, de la solution d'une base forte ou d'un acide fort utilisée en catalyse chimique. L'équilibre imidazole-imidazolium de la chaîne latérale de l'histidine est idéal pour le transfert d'un proton à un pH proche de la neutralité. Le groupe carboxyle de la chaîne latérale des acides aspartique et glutamique, dont la valeur du pK_a dans les protéines est voisine de 4, a lui aussi une fonction de catalyseur acide-base dans certains enzymes.

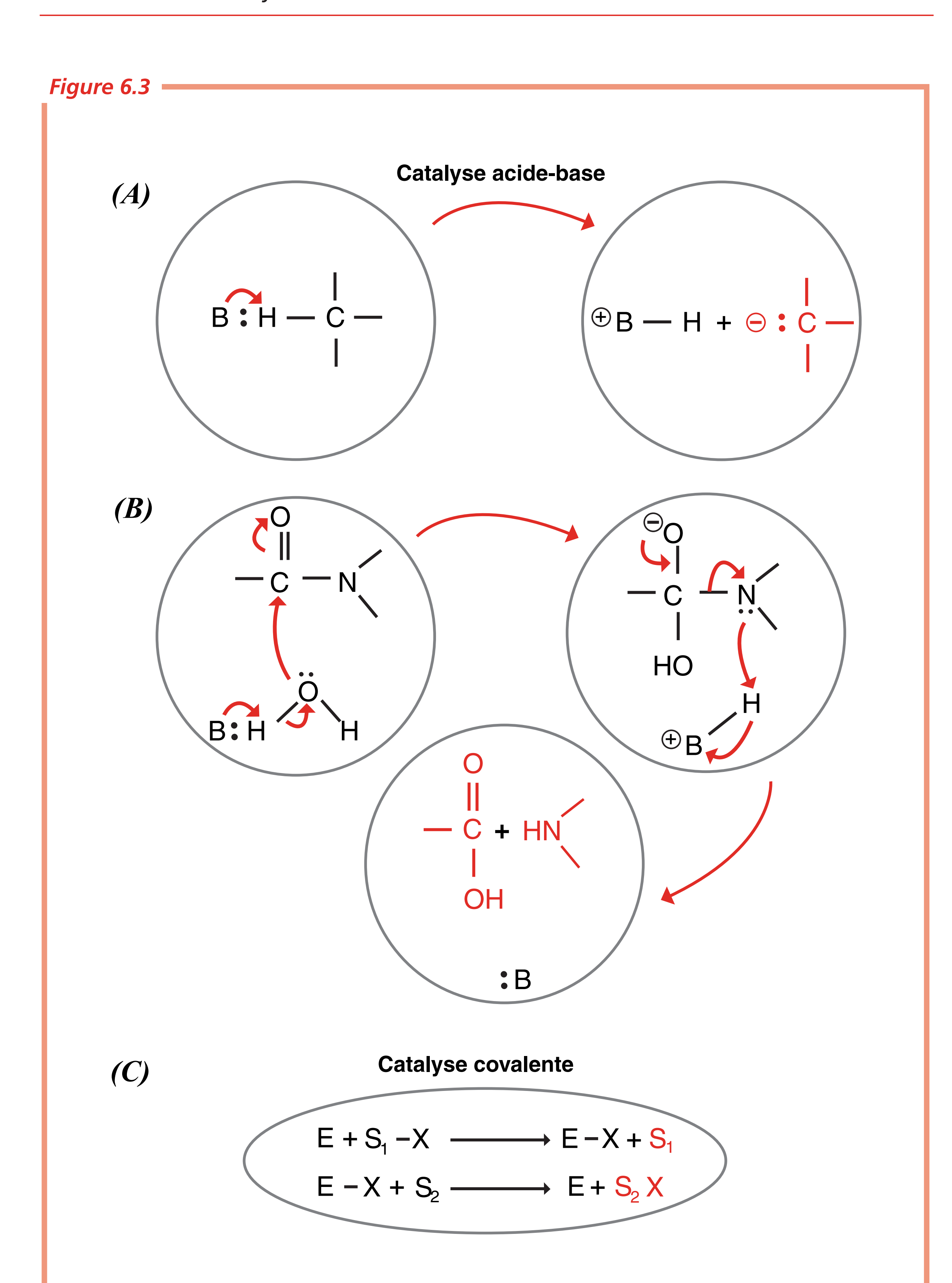
LA CATALYSE COVALENTE

Environ 20 % des réactions enzymatiques sont effectuées par catalyse covalente (*Figure 6.3C*). En effet, de nombreuses réactions enzymatiques de transfert de groupes font intervenir ce mécanisme. Dans une première étape, le groupe X d'un substrat $S_1 - X$ est uni par covalence à l'enzyme E. Dans une étape ultérieure, il est transféré à un second substrat S_2.

Au sein des enzymes, la catalyse covalente est effectuée par des résidus sérine ou cystéine. Ces enzymes présentent une cinétique Ping-Pong caractéristique.

LA LIAISON STÉRÉOSPÉCIFIQUE DES RÉACTIFS JOUE UN RÔLE IMPORTANT DANS LA CATALYSE ENZYMATIQUE

Les effets chimiques, catalyse acide-base ou catalyse covalente, accélèrent les réactions enzymatiques d'un facteur compris entre 10 et 100. Ils ne permettent donc absolument pas d'expliquer les vitesses observées dans les réactions enzymatiques qui sont plusieurs milliers, voir plusieurs millions de fois plus grandes que celles des mêmes réactions non catalysées par un enzyme. C'est ici encore la propriété de reconnaissance discriminative stéréospécifique des protéines globulaires qui explique l'extraordinaire efficacité des enzymes sur les vitesses de réaction. En effet, la liaison selon une orientation précise des réactifs au niveau du site actif des enzymes est à l'origine, non seulement de la spécificité de la réaction, mais aussi d'une grande part du pouvoir catalytique. En ce sens, l'enzyme est un réacteur moléculaire où les réactifs sont non seulement sélectionnés mais concentrés et assemblés dans une orientation qui détermine et stabilise les états de transition. Ces deux effets de liaison sont dénommés effet de proximité et effet de stabilisation de l'état de transition, respectivement.


Figure 6.3
(A)
Catalyse acide-base
B : H — C —
⊕B — H + ⊖ : C —
(B)
O
— C — N
Ö
B : H
H
⊖O
— C — N
HO
H
⊕B
O
— C + HN
OH
: B
(C)
Catalyse covalente
E + S1 −X ⟶ E −X + S1
E −X + S2 ⟶ E + S2 X

EFFET DE PROXIMITÉ

Dans une solution diluée, la probabilité pour que deux molécules se rencontrent et forment un état de transition est faible. Il est possible de concevoir et de synthétiser des molécules organiques où s'effectue une réaction intramoléculaire identique à une réaction bimoléculaire et où les degrés de liberté des réactifs sont progressivement réduits (*Figure 6.4A*). La mesure des vitesses de réaction permet de déterminer l'importance de l'effet de proximité.

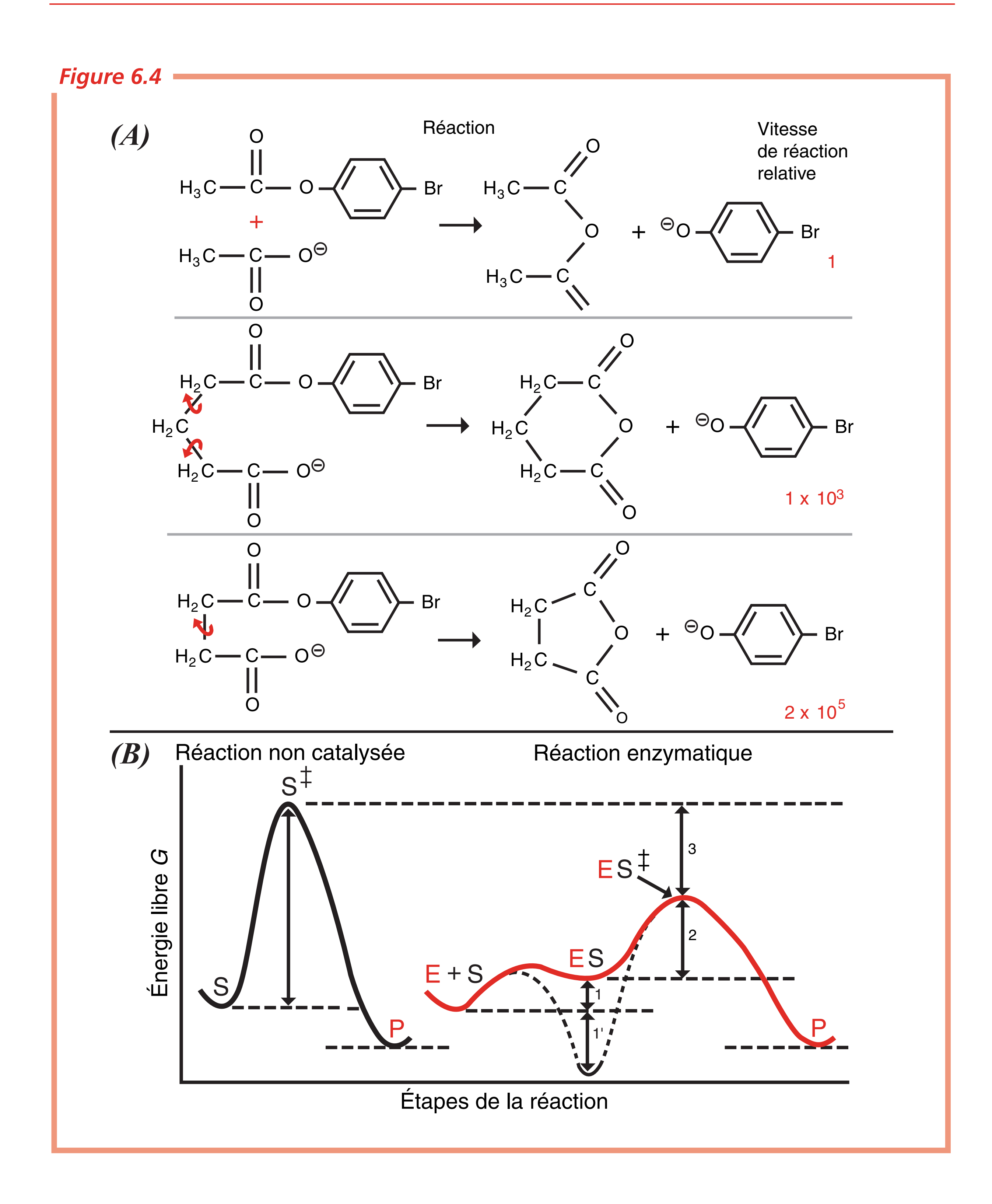
Dans une réaction intramoléculaire non enzymatique, le facteur d'accélération maximal est de l'ordre de 10^8. Au sein du site actif d'un enzyme, où les substrats sont proches et en position favorable pour agir l'une sur l'autre, la réaction s'apparente à une réaction intramoléculaire. En d'autres termes, il y a une diminution de l'entropie qui permet une accélération de la vitesse de réaction. Cependant, dans une réaction enzymatique, le facteur d'accélération ne dépasse pas 10^4.

Les valeurs des K_M, qui représentent des constantes de dissociation, indiquent que les réactifs ne sont pas aussi proches dans les complexes enzyme-substrat qu'ils ne le sont dans l'état de transition. La comparaison de l'évolution de l'énergie libre au cours des étapes de la réaction non catalysée et de la réaction enzymatique (*Figure 6.4B*) montre que si le complexe enzyme-substrat ES était trop stable, son énergie se situerait dans un puits de potentiel et l'énergie nécessaire pour la porter au niveau de celle de l'état de transition $ES^‡$ serait aussi grande que l'énergie d'activation de la réaction non catalysée $S \rightarrow S^‡$; dans de telles conditions, l'enzyme n'aurait pas de vraie fonction catalytique. Ainsi donc, les enzymes mettent les substrats en position stable avant que le complexe ES n'atteigne l'état de transition, mais cette stabilité n'est pas telle que les substrats aient perdu toute leur entropie dans la formation d'un complexe trop rigide.

Les valeurs des K_M des enzymes de faible spécificité sont élevées, de même que celles des enzymes dont les substrats sont de petites molécules, telles celles du dioxyde de carbone, de l'anion superoxyde ou de l'urée, qui ne peuvent former que peu de liaisons non covalentes avec la protéine enzymatique. Les valeurs des K_M des enzymes qui se lient à de plus grosses molécules sont plus faibles ; c'est le cas pour les enzymes qui fixent des coenzymes de type cosubstrat. Des valeurs de K_M encore plus faibles traduisent une étroite association entre l'enzyme et le réactif ; c'est le cas pour les enzymes qui fixent des coenzymes dénommés groupes prosthétiques, qui sont des composants permanents du site actif, et pour lesquels K_M est de l'ordre de 10^{-4}. Un enzyme dont le K_M est très faible doit avoir aussi un k_{cat} faible, car le rapport k_{cat}/K_M ne peut pas être supérieur à la limite imposée par la vitesse de diffusion, qui est de l'ordre de 10^8.

EFFET CIRCÉ

L'enzyme se présente donc comme un réacteur moléculaire où les réactifs sont sélectionnés et assemblés dans une orientation déterminée. On peut se demander s'il ne pourrait pas aussi capter les réactifs plus vite que ne le permet la simple diffusion, c'est-à-dire s'il n'y aurait pas des forces qui attirent, ou du moins guident, les substrats vers le site actif. En 1975, William Jencks a proposé un mécanisme de diffusion accélérée, appelé effet Circé, qui



explique le rapport k_{cat}/K_M ($2{\cdot}10^9$ M^{-1} s^{-1}) de la superoxyde dismutase, enzyme qui élimine très rapidement l'anion radicalaire superoxyde $•O^{2-}$. Un champ électrique intense au niveau de l'entrée du site actif attire cet anion et laisse sortir librement le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui n'est pas chargé.

EFFET DE STABILISATION DE L'ÉTAT DE TRANSITION

Un substrat S, pour former un produit P, doit nécessairement passer par un état de transition $S^‡$ dont l'énergie libre de Gibbs, $G_{S^‡}$, est plus grande que celles de S et de P, G_S, et G_P, respectivement.

L'énergie libre d'activation de Gibbs $\Delta G^‡$ est donnée par la relation :

$$\Delta G^‡ = G_{S^‡} - G_S$$

La concentration de $S^‡$, $[S^‡]$, est donnée par la relation :

$$[S^‡] = [S]e^{-\Delta G^‡/RT}$$

Dans cette équation, R est la constante des gaz parfaits et T la température absolue.

La vitesse de réaction V_0 est proportionnelle à la concentration de $S^‡$:

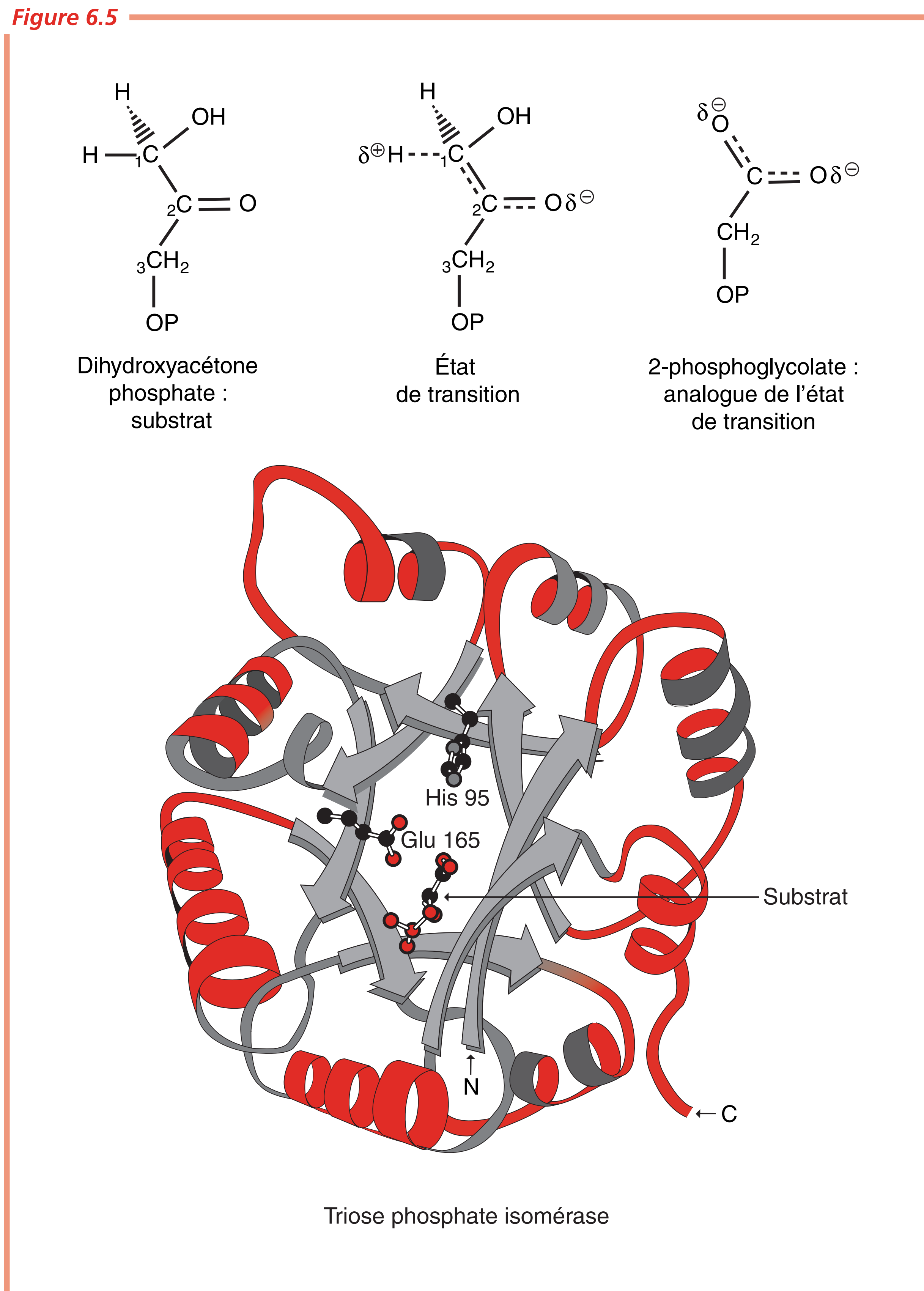
$$V_0 = \frac{kT}{h}e^{-\Delta G^‡/RT}$$

Dans cette équation, k est la constante de Boltzmann et h la constante de Planck.

Les enzymes accélèrent donc les réactions en diminuant la valeur de la barrière d'activation $\Delta G^‡$. Dès les années 1920, il a été émis l'hypothèse que le pouvoir catalytique des enzymes résulte pour la plus large part de leur aptitude à fixer avec une forte affinité les réactifs dans leur état de transition. De nombreuses preuves expérimentales sont venues à l'appui de cette théorie. Les premières ont été apportées par la découverte que les analogues structuraux de l'état de transition étaient de puissants inhibiteurs de l'activité enzymatique, comme c'est le cas, par exemple, pour la triose phosphate isomérase (TIM) (*Figure 6.5*). La TIM catalyse le transfert d'un atome d'hydrogène du carbone 1 au carbone 2 en convertissant le dihydroxy-acétone phosphate en glycéraldéhyde 3-phosphate ; cette réaction est une oxydo-réduction intramoléculaire. Cette isomérisation d'un cétose en un aldose passe par un énediol intermédiaire. Le glutamate 165 joue le rôle d'un catalyseur acide-base général. Cependant, ce groupe carboxylate par lui-même n'est pas suffisamment basique pour chasser un proton d'un atome de carbone adjacent à un groupe carbonyle. L'histidine 95 participe à la catalyse en donnant un proton pour stabiliser la charge négative qui se développe sur le groupe carbonyle en C-2.

Par la suite, l'étude au niveau moléculaire du mécanisme catalytique de certains enzymes, tels que le lysozyme, la tyrosyl-tRNA synthétase ou la chymoprypsine, entre autres, a permis de préciser le rôle joué par certains aminoacides du site actif dans la stabilisation de l'état de transition, préalablement à la catalyse par effet chimique.

Figure 6.5



Triose phosphate isomérase

MÉCANISME DE L'HYDROLYSE D'UNE LIAISON OSIDIQUE PAR LE LYSOZYME

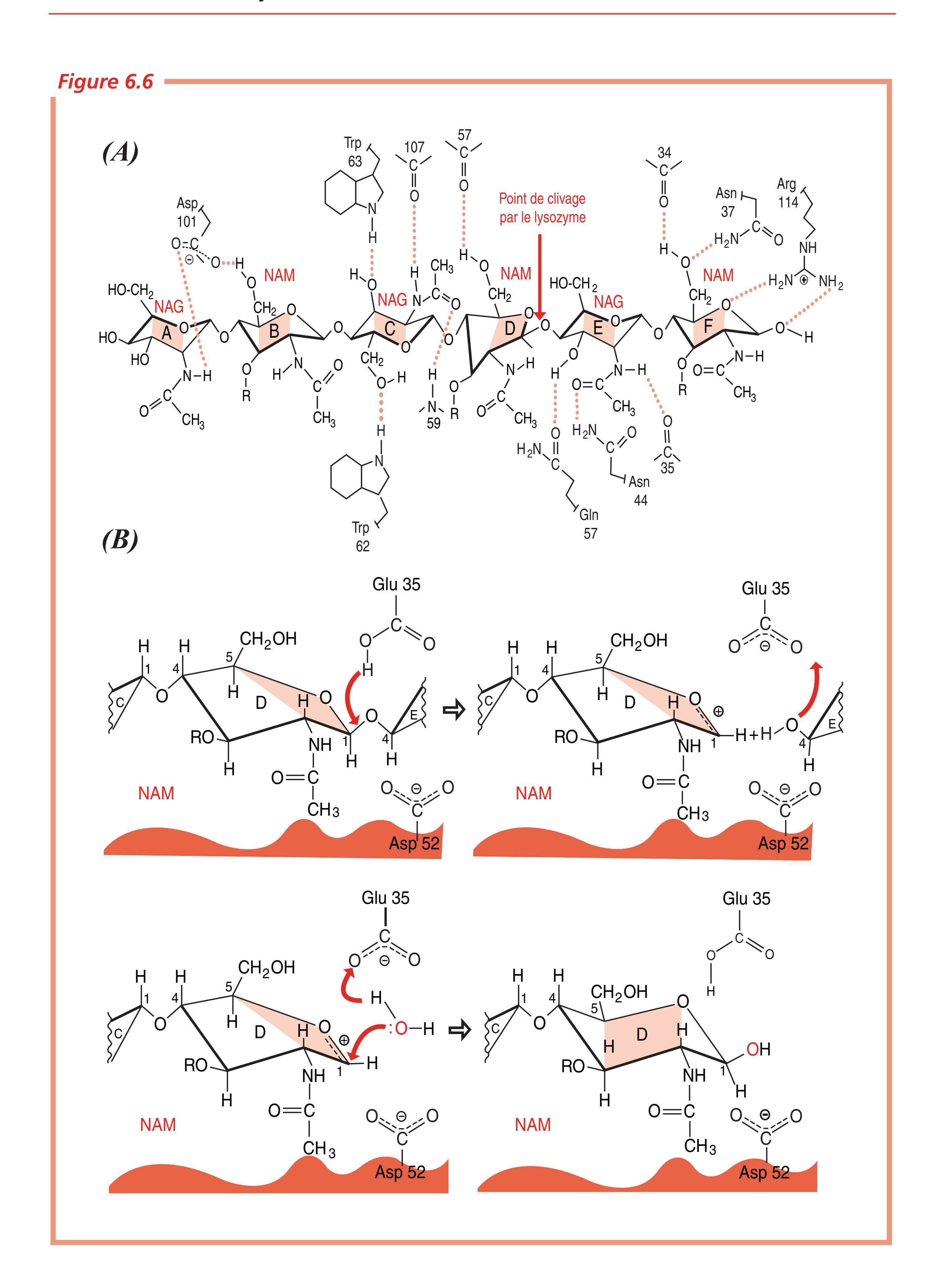
Le lysozyme, enzyme des Bactériophages, du blanc d'œuf, des sécrétions lacrymales, nasales, etc., catalyse spécifiquement l'hydrolyse de polysaccharides constitutifs de la paroi des bactéries. En effet, la paroi de certaines bactéries contient un polysaccharide (*Figure 6.6A*) qui est un copolymère alterné de résidus *N*-acétylglucosamine (NAG) et *N*-acétylmuramate (NAM) unis par des liaisons glycosidiques β (1→4). De même, la coquille de certains crustacés contient de la chitine, qui est un polysaccharide constitué uniquement de résidus NAG unis, eux aussi, par des liaisons glycosidiques β (1→4). Le lysozyme clive les liaisons glycosidiques β (1→4) unissant le C-1 d'un résidu NAM du copolymère NAG-NAM ou d'un résidu NAG de la chitine au C-4 du résidu NAG suivant dans des fragments polysaccharidiques possédant au moins six résidus.

La structure tridimensionnelle et le mécanisme d'action du lysozyme ont été élucidés dans le laboratoire de David Philipps, à la fin des années 1960, grâce à l'étude par diffraction des rayons X de cristaux de lysozyme complexé à un substrat ou à un inhibiteur compétitif, tel que la tri-*N*-acétylglucosamine (tri-NAG). Le lysozyme est une protéine globulaire compacte, de masse moléculaire 13 900 Da ; sa forme est approximativement celle d'un ellipsoïde de dimensions 45 × 30 × 30 Å. Le lysozyme du phage T4 a 11 hélices α et 5 brins β répartis dans des feuillets plissés. Comme dans beaucoup d'autres protéines globulaires, de nombreuses interactions hydrophobes assurent le repliement des hélices et des feuillets plissés de la chaîne polypeptidique et font de la partie interne de la molécule un espace très hydrophobe.

Le substrat se fixe dans une crevasse située à la surface de l'enzyme, au niveau de six sites désignés de A à F (*Figure 6.6A*), grâce à des liaisons hydrogène et des interactions de van der Walls. Les résidus osidiques en conformation chaise s'adaptent aisément aux sites A, B, C, E et F. Il n'en va pas de même pour le résidu destiné à se loger dans le site D car ses atomes C-6 et O-6 devraient s'approcher trop près de certains groupes de l'enzyme. Pour s'insérer dans le site actif de l'enzyme, ce résidu doit subir une adaptation induite consistant en une distorsion du cycle pyrannique qui adopte alors la conformation demi-chaise.

Un mécanisme catalytique d'hydrolyse de liaisons glycosidiques β (1→4) par le lysozyme a été proposé par Phillips. Il met en évidence le rôle joué par deux résidus aminoacide polaires ionisables, Glu 35 et Asp 52 (*Figure 6.6B*). Ces aminoacides sont proches de la liaison glycosidique unissant le C-1 du résidu osidique logé dans le site D et le C-4 du résidu osidique logé dans le site E. Glu 35, qui se trouve dans un environnement non polaire de la crevasse, a un pK_a d'environ 6,5. Asp 52, qui se trouve dans un environnement plus polaire, a un pK_a d'environ 3,5. Le pH optimal du lysozyme est donc intermédiaire entre ces deux valeurs, à environ 5. Glu 35, protoné à pH 5, assure la fonction de catalyseur acide-base, tandis que Asp 52, déprotoné à ce même pH, assume celle de stabilisateur de l'ion carbonium intermédiaire.

Le mécanisme du lysozyme illustre bien les rôles joués par la stabilisation de l'état de transition et par la catalyse acide-base dans l'activité enzymatique.


Figure 6.6
(A)
Point de clivage
par le lysozyme
NAG
NAM
A
B
C
D
E
F
Asp 101
Trp 63
Trp 62
Gln 57
Asn 44
Asn 37
Arg 114
(B)
Glu 35
Asp 52
NAM
CH2OH
RO
NH
O=C
CH3

MÉCANISME DE L'ACTIVATION DE LA TYROSINE PAR UNE AMINOACYL-tRNA SYNTHÉTASE

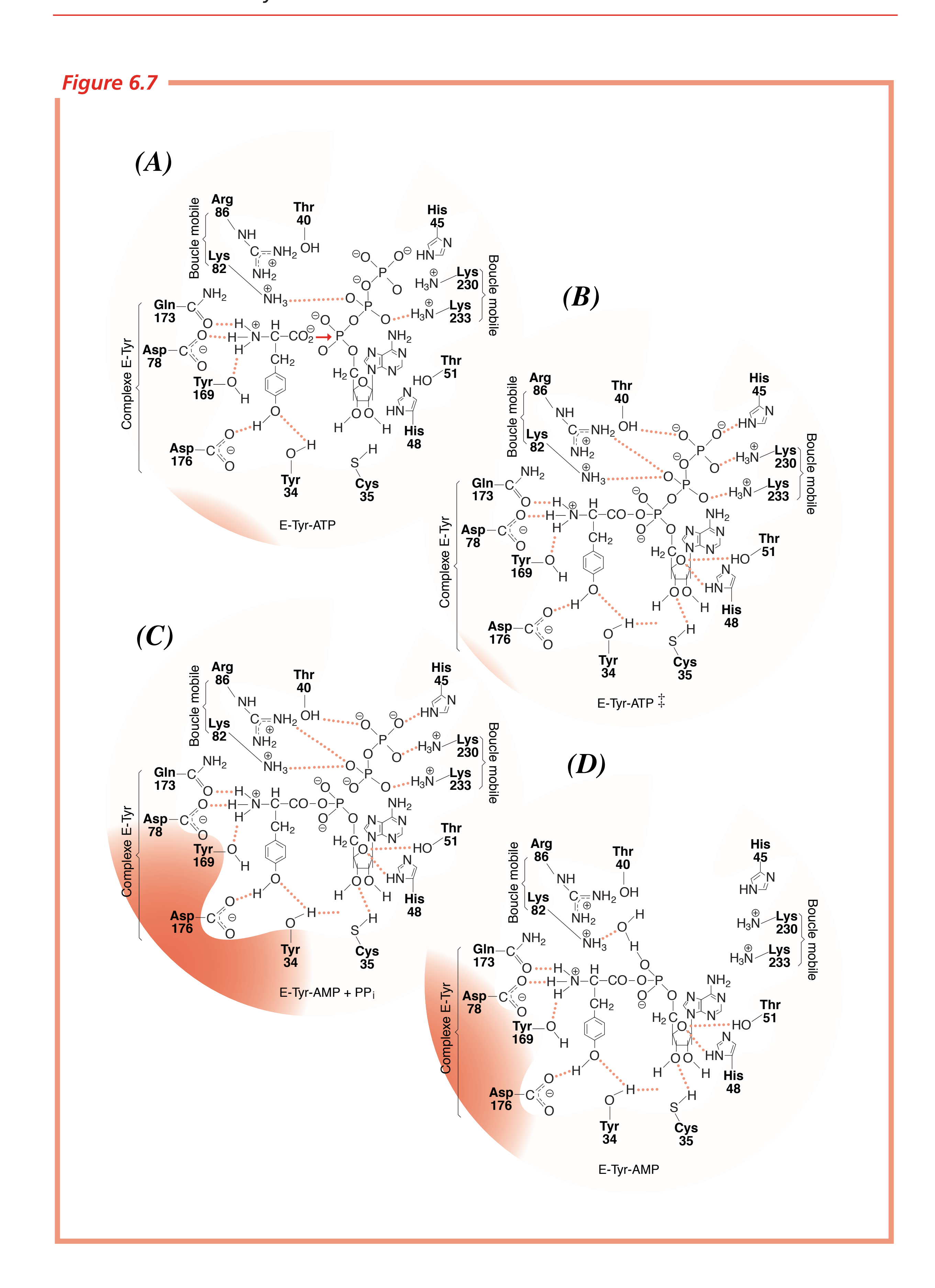
Des aminoacyl-tRNA synthétases spécifiques activent les aminoacides et les lient à un tRNA capable de reconnaître les codons des mRNA ; les aminoacyl-tRNA ainsi formés peuvent alors participer à la synthèse des chaînes polypeptidiques (p. 384). La réaction évolue en deux étapes :

$$\text{Aminoacide} + \text{ATP} \rightarrow \text{aminoacyl-AMP} + \text{PP}_i$$
$$\text{Aminoacyl-AMP} + \text{tRNA} \rightarrow \text{aminoacyl-tRNA} + \text{AMP.}$$

La structure tridimensionnelle de la tyrosyl-tRNA synthétase d'*Escherichia Coli* cristallisée a été déterminée par diffraction des rayons X et le mécanisme de formation du tyrosyl-AMP a été élucidé à la fin des années 1980 dans le laboratoire d'Alan Fersht, grâce aux résultats d'expériences de mutagenèse dirigée, entre autres. Ce mécanisme montre le rôle joué par les liaisons hydrogène dans la stabilisation de l'état de transition (*Figure 6.7*). Il montre aussi l'importance de l'adaptation induite dans la catalyse enzymatique. En effet, un enzyme catalyse une réaction en se liant spécifiquement à l'état de transition de la réaction. Mais, l'enzyme libre n'étant pas toujours structuralement complémentaire de l'état de transition, il doit nécessairement subir une distorsion. La distorsion de la structure de l'enzyme lors de l'état de transition implique une dépense d'énergie, ce qui est donc défavorable pour la catalyse. L'enzyme doit faire face à deux problèmes : permettre aux substrats d'accéder au site actif, puis entourer l'état de transition avec les charges nécessaires à sa stabilisation. Le compromis est d'avoir un site actif ouvert avec des groupes de liaison dans des régions flexibles de la protéine et d'utiliser une partie de l'énergie de liaison du substrat pour distordre l'enzyme lors de la liaison.

La tyrosyl-tRNA synthétase possède deux boucles très mobiles : l'une et constituée par les résidus Lys 82 et Arg 86, l'autre par les résidus Lys 230 et Lys 133. Ces quatre résidus doivent entrer en interaction aussi bien avec l'ATP qu'avec l'état de transition ou le groupe pyrophosphate ; il y a donc nécessairement un mécanisme d'adaptation induite. L'ATP se fixe sur le complexe enzyme-tyrosine et attire à lui les résidus Lys 82 et Lys 233 auxquels il se lie. À ce stade, il n'y a pas encore d'interactions avec Arg 86 et Lys 230, ni avec Cys 35, His 48, Thr 51, His 45 et Thr 40 (*Figure 6.7A*). Grâce à une adaptation induite de l'enzyme, les groupes précédemment cités entrent en interaction avec le pyrophosphate et le ribose de l'ATP (*Figure 6.7B*). Après hydrolyse de l'ATP, les groupes précédents sont toujours en interaction avec cet intermédiaire (*Figure 6.7C*). La boucle Lys 230-Lys 233 s'écarte de l'adénylate après la dissociation de PPi et Lys 82 se lie à l'α-phosphate de Tyr-AMP par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (*Figure 6.7D*).

Figure 6.7


(A)
Boucle mobile
Arg 86
Thr 40
His 45
Lys 82
Lys 230
Lys 233
Boucle mobile
Gln 173
Complexe E-Tyr
Asp 78
Tyr 169
Thr 51
His 48
Asp 176
Tyr 34
Cys 35
E-Tyr-ATP
(B)
Boucle mobile
Arg 86
Thr 40
His 45
Lys 82
Lys 230
Lys 233
Boucle mobile
Gln 173
Complexe E-Tyr
Asp 78
Tyr 169
Thr 51
His 48
Asp 176
Tyr 34
Cys 35
E-Tyr-ATP ‡
(C)
Boucle mobile
Arg 86
Thr 40
His 45
Lys 82
Lys 230
Lys 233
Boucle mobile
Gln 173
Complexe E-Tyr
Asp 78
Tyr 169
Thr 51
His 48
Asp 176
Tyr 34
Cys 35
E-Tyr-AMP + PPi
(D)
Boucle mobile
Arg 86
Thr 40
His 45
Lys 82
Lys 230
Lys 233
Boucle mobile
Gln 173
Complexe E-Tyr
Asp 78
Tyr 169
Thr 51
His 48
Asp 176
Tyr 34
Cys 35
E-Tyr-AMP

MÉCANISME D'ACTION ET CLASSIFICATION DES COENZYMES

Dans de nombreuses réactions enzymatiques, outre le substrat spécifique, prend part un autre composé dénommé coenzyme. Un même coenzyme est en général associé à des enzymes catalysant des réactions de même type, mais la spécificité de l'enzyme envers le substrat demeure liée à la protéine.

La plupart des réactions enzymatiques faisant intervenir un coenzyme Co peuvent se ramener à des réactions de transfert où un radical R est transféré d'un donneur D à un accepteur A.

$$\mathrm{DR + A} \xrightleftharpoons{\mathrm{E + Co}} \mathrm{D + AR}$$

Dans ces réactions, le coenzyme Co intervient en s'unissant au radical R, puis en le transférant à l'accepteur A :

$$\mathrm{DR + Co} \rightleftharpoons \mathrm{CoR + D}$$

$$\mathrm{CoR + A} \rightleftharpoons \mathrm{Co + AR}$$

Le coenzyme engagé dans la première étape est régénéré dans la seconde. Il joue donc un rôle catalytique, comme l'enzyme lui-même.

Selon les réactions, les deux étapes peuvent être effectuées par le même enzyme ou par deux enzymes différents, ce qui conduit à distinguer deux types de coenzymes et, donc, de réactions à coenzymes. Dans le premier cas, le composé intermédiaire CoR n'est pas libéré ; le coenzyme, qui est un groupe prosthétique, demeure attaché à l'enzyme et intervient comme activateur. Dans le second cas, le composé intermédiaire CoR se dissocie du site actif ; le coenzyme, qui est alors un cosubstrat, intervient comme transporteur.

Les principaux coenzymes sont répertoriés dans le *Tableau 6.3*. Ils ont des origines diverses. Certains coenzymes sont synthétisés à partir d'intermédiaires du métabolisme ; ce sont pour la plupart des nucléotides ou des dérivés nucléotidiques. D'autres coenzymes dérivent des vitamines, composés qui ne peuvent pas être synthétisés par les animaux et doivent donc être apportés par les aliments. Une carence vitaminique entraîne des troubles importants si le déficit n'est pas corrigé rapidement (*Tableau 6.4*).

Tableau 6.4

Vitamine	Conséquence d'un déficit
Thiamine (B_1)	Béribéri
Acide nicotinique	Pellagre
Acide folique	Anémie
B_{12}	Anémie, acidose méthylmalonique
C (acide ascorbique)	Scorbut

Vitamine	Conséquence d'un déficit
A	Héméralopie
D	Rachitisme, ostéolacie
E	Inhibition de la production du sperme
K	Hémorragie sous-cutanée

Tableau 6.3

Coenzyme	Rôle métabolique	Origine vitaminique
Principaux coenzymes activateurs		
Flavine mononucléotide (FMN) Flavine adénine dinucléotide (FAD)	Réaction d'oxydoréduction impliquant le transfert d'un ou de deux électrons	Riboflavine (vitamine B_2)
Thiamine pyrophosphate (TPP)	Transfert de groupes aldéhyde	Thiamine (vitamine B_1)
Pyridoxal phosphate (PLP)	Transfert de groupes appartenant à des aminoacides	Pyridoxine (vitamine B_6)
Biotine	Carboxylations et transfert de carboxyles	Biotine (vitamine H)
Adénosylcobalamine Méthylcobalamine	Réarrangements intramoléculaires et transfert de méthyles	Cobalamine (vitamine B_{12})
Lipoamide	Oxydation d'un groupe hydroxyalkyle	Vitamine A
cis-Rétinal	Vision	Vitamine K
Vitamine K	Carboxylation de résidus glutamate	
Principaux coenzymes transporteurs		
Adénosine triphosphate (ATP)	Transfert de phosphoryles ou de nucléotides	
S-adénosylméthionine	Transfert de méthyles	
Phophoadénosine phosphosulfate (PAPS)	Transfert de sulfuryles	
Oses nucléotidylés	Transfert de groupes carbohydrate	
Alcools cytidylés	Transfert d'alcools dans la synthèse des lipides	
Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+), Nicotinamide adénine dinucléotide phophate ($NADP^+$)	Réactions d'oxydoréduction impliquant le transfert de deux électrons	Niacine
Coenzyme A	Transfert d'acyles	Pantothénate
Tétrahydrofolate	Transfert de groupes monocarbonés	Folate
Ubiquinone	Transport d'électrons	

LES COENZYMES NUCLÉOTIDIQUES

Dans la cellule, l'énergie captée au cours de la photosynthèse ou libérée lors du catabolisme est utilisée dans les processus nécessitant un apport d'énergie, tels que la synthèse du DNA, du RNA ou des protéines, la création de potentiels d'action, le transport actif ou le mouvement. Ces échanges d'énergie passent par des coenzymes nucléotidiques qui se répartissent en deux classes, selon la région du nucléotide qui médie le transfert d'énergie.

Une classe est celle des nucléotides pyridiniques, NAD et NADP (*Figure 6.8A*), et des nucléotides flaviniques, FMN et FAD (*Figure 6.8B*), dont une base, le nicotinamide ou l'isoalloxazine, respectivement, est susceptible de transférer des électrons lors de processus d'oxydoréduction. Les coenzymes pyridiniques ne peuvent participer qu'à des réactions mettant en jeu le transfert de deux électrons. Les coenzymes flaviniques, en revanche, cèdent soit un seul, soit deux électrons à la fois, car la forme radicalaire intermédiaire partiellement oxydée : FMNH• ou FADH•, appelée flavosemiquinone, est relativement stable. Ces nucléotides interviennent dans de nombreux processus métaboliques où le transfert des électrons entre les nucléotides et les métabolites est assumé par des déshydrogénases. Au sein de ces enzymes, les nucléotides pyridiniques se comportent comme des cosubstrats, les nucléotides flaviniques comme des groupes prosthétiques.

Une autre classe est celle des nucléotides adényliques ou guanyliques, l'ATP et le GTP, dont l'unité triphosphate possède un potentiel de transfert de groupe phosphoryle élevé (*Figure 6.8C*). Ces nucléotides participent à de nombreux processus où le transfert de groupes phosphoryle entre les nucléotides et les constituants cellulaires est assumé par des kinases. Cependant, le don de groupes phosphoryle n'est pas la seule réaction à laquelle participe l'ATP. Les autres groupes constitutifs de cette molécule : pyrophosphoryle, adénylyle (AMP) ou adénosyle, peuvent être eux aussi transférés. Dans les mitochondries, le transfert des électrons et le système des groupes phosphoryle de haute énergie sont couplés lors du processus de phosphorylation oxydative où l'apport d'énergie de nucléotides réduits permet la synthèse d'ATP (p. 237).

Figure 6.8

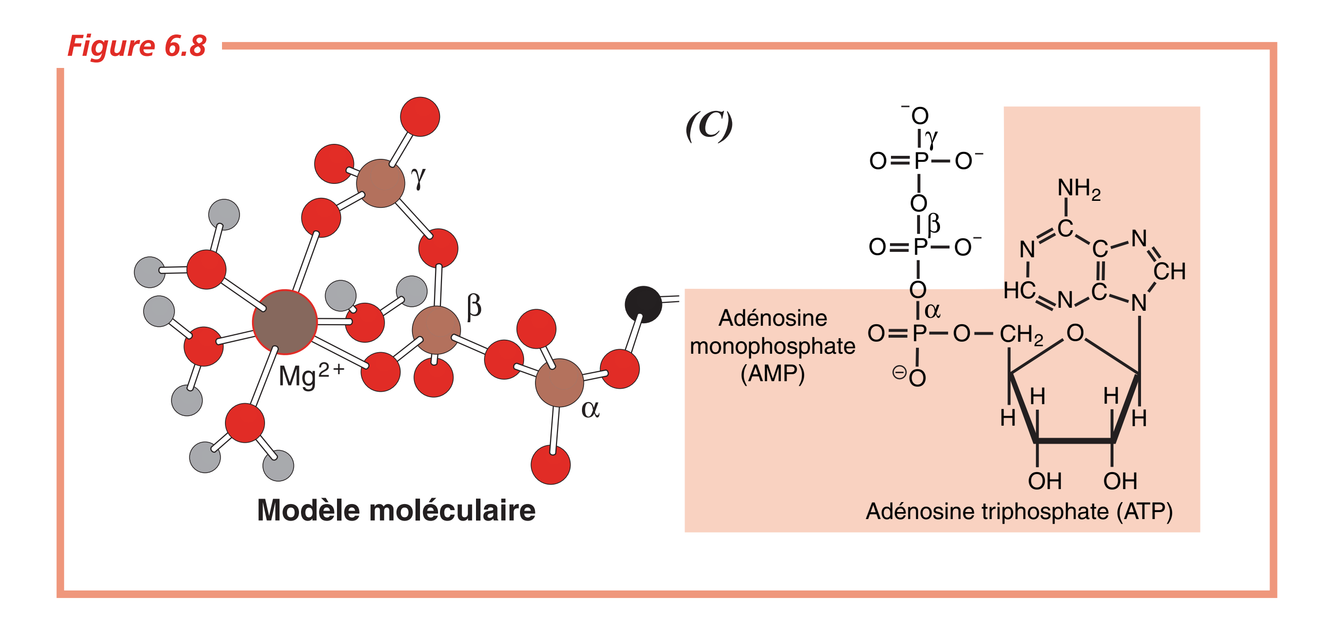


Figure 6.8

(A)

NAD $^+$

Nicotinamide mononucléotide (NMN)

Site réactif

$CONH_2$

réduction du nicotinamide

NADH

$+H^+$

ou

Adénosine monophosphate (AMP)

NH_2

phosphorylation du ribose

NADP$^{\oplus}$, NADPH

(B)

FMN, FAD

Site réactif

réduction de l'isoalloxazine

$FMNH_2$, $FADH_2$

Flavine mononucléotide (FMN)

Adénosine monophosphate (AMP)

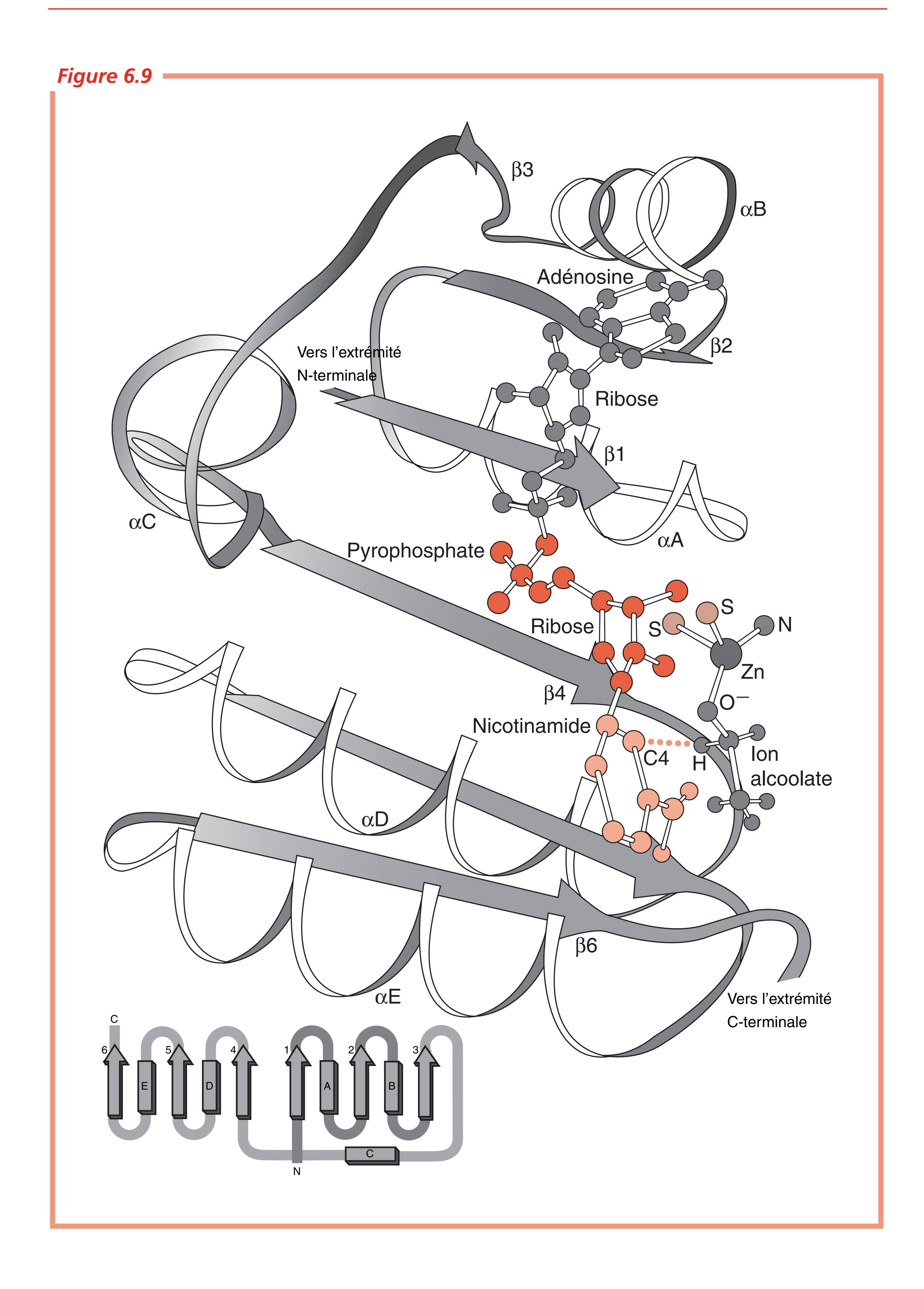
LE MOTIF DE LIAISON DES NUCLÉOTIDES ET LES DÉSHYDROGÉNASES NAD-DÉPENDANTES

Les déshydrogénases NAD-dépendantes forment une famille d'une centaine de protéines, parmi lesquelles figurent la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, l'alcool déshydrogénase et la lactate déshydrogénase. Au cours de la réaction réversible catalysée par ces enzymes (*Figure 4.22*), un hydroxyle alcoolique du substrat est oxydé grâce au transfert d'un hydrogène lié au carbone porteur de cet hydroxyle vers la forme oxydée du coenzyme, le NAD^+. De plus, un proton est éliminé de l'hydroxyle.

Les déshydrogénases citées précédemment sont de grosses molécules protéiques entre lesquelles il n'y a aucune homologie de séquence. Cependant, leur structure tridimensionnelle montre que leur longue chaîne polypeptidique se replie en deux domaines nettement distincts, qui ont chacun des fonctions différentes. L'un fixe le coenzyme, l'autre se lie spécifiquement au substrat et apporte les aminoacides nécessaires à la catalyse. Les domaines de liaison du substrat des différentes déshydrogénases sont très différents, mais les domaines de liaison du NAD sont très semblables. Ils sont constitués par environ 140 aminoacides qui forment un feuillet plissé de six brins β parallèles, entouré de chaque côté de deux hélices α (*Figure 6.9*). Cet ensemble α/β apparaît constitué de deux moitiés symétriques de topologie et de structure identiques appelées motif de Rossmann ou motif de liaison des mononucléotides, ou encore motif de repliement nucléotidique, car cette structure, qui ne fixe qu'un seul des deux nucléotides du NAD, est retrouvée dans les protéines qui se lient à d'autres mononucléotides, tels que le FMN ou l'ATP. Le NAD se fixe à l'extérieur des extrémités carboxyliques des brins β 1 et 4, là où ces brins se replient (*Figure 6.9*). L'adénosine se lie au premier motif de liaison des mononucléotides, β1-αA-β2, le nicotinamide-ribose au second, β4-αD-β5, tandis que le groupe pyrophosphate fait face à la région centrale du domaine.

Le site actif se situe dans la crevasse qui sépare les deux domaines. Les sites de liaison du NAD et du substrat, chacun dans leur domaine respectif, sont orientés de telle façon que la partie réactive du coenzyme, en l'occurrence l'atome de carbone C-4 du cycle nicotinamide, soit proche de l'atome d'hydrogène substrat à transférer. Dans la lacticodéshydrogénase et la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, les domaines sont flexibles et se rapprochent l'un de l'autre lors de la catalyse ; les réactifs sont alors complètement isolés du milieu aqueux environnant pendant le transfert d'hydrogène. Dans l'alcool déshydrogénase, un ion Zn^{2+} est coordonné aux atomes de soufre de deux résidus cystéine et à l'un des atomes d'azote d'un résidu histidine du domaine catalytique ; il polarise le carbonyle du substrat et stabilise l'état de transition.

Figure 6.9



β3
αB
Adénosine
β2
Vers l'extrémité
N-terminale
Ribose
β1
αC
αA
Pyrophosphate
S
N
Ribose
S
Zn
β4
O−
Nicotinamide
C4
H
Ion
alcoolate
αD
β6
αE
Vers l'extrémité
C-terminale
C
6
5
4
1
2
3
E
D
A
B
C
N

LE DOMAINE DE LIAISON DU FAD EST SEMBLABLE AU DOMAINE DE LIAISON DU NAD

La structure tridimensionnelle de deux déshydrogénases FAD-dépendantes : la glutathion réductase des mammifères et la *p*-hydroxybenzoate hydroxylase des Bactéries, où le flavine adénine dinucléotide (FAD) est le coenzyme, montre qu'un motif β1-αA-β2 est responsable de la liaison de la partie ADP. Il subit les mêmes contraintes que celles qui sont imposées aux enzymes à NAD. Les résidus glycine et les résidus hydrophobes sont conservés, mais un glutamate, et non plus un aspartate, entre en interaction avec l'hydroxyle 2'-OH du ribose de l'adénosine.

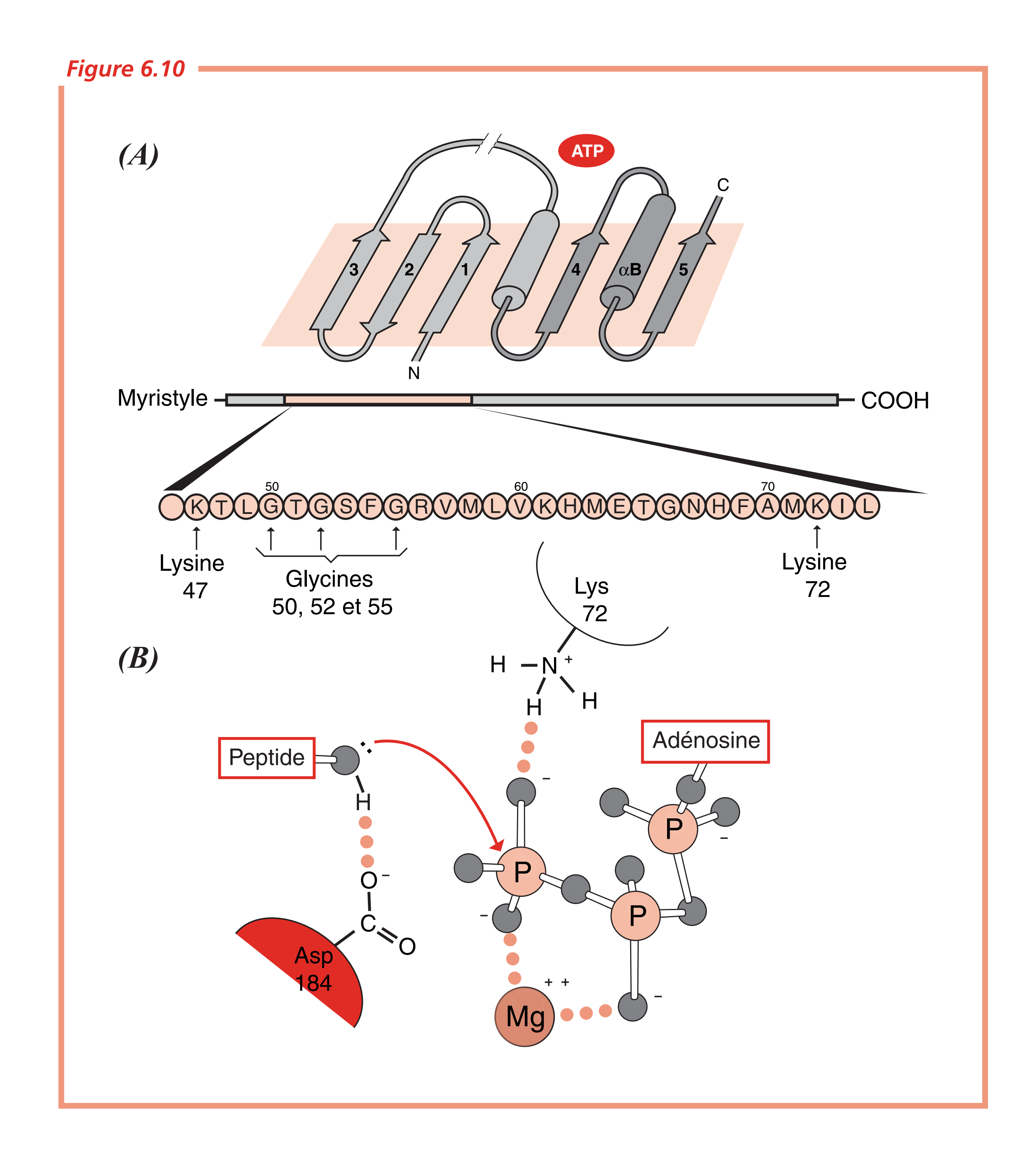
LE DOMAINE DE LIAISON DE L'ATP EST, LUI AUSSI, SEMBLABLE AU DOMAINE DE LIAISON DU NAD

Beaucoup de protéines, et parmi celles-ci de nombreux enzymes tels que les kinases, se lient au Mg^{2+}-ATP. La structure tridimensionnelle d'un certain nombre de ces protéines : actine, protéine de choc thermique HSC 70, hexokinase, domaines catalytiques des protéines kinases, montre que ces protéines, bien que présentant des topologies très différentes, possèdent un domaine de liaison du Mg^{2+}-ATP commun, de type αβ, très semblable au motif de liaison des nucléotides de Rossmann, avec l'ATP fixé au niveau d'une boucle.

L'hexokinase (p. 108) est un enzyme qui catalyse la conversion du glucose en glucose 6-phosphate. Sa chaîne polypeptidique d'environ 485 aminoacides est reployée en deux domaines mobiles autour d'une région charnière. Le plus petit des deux domaines est formé d'un feuillet β antiparallèle et de quelques hélices α. Le plus gros des deux domaines est constitué d'un feuillet mixte αβ qui peut se lier au Mg^{2+}-ATP et d'un certain nombre d'hélices α. Tant que l'hexokinase n'a pas fixé de glucose, ses deux domaines sont séparés par une profonde crevasse. La fixation d'ATP n'induit pas de changements conformationnels de l'enzyme, mais, en revanche, la liaison du glucose provoque une rotation du petit domaine qui referme la crevasse. Cette adaptation induite de l'enzyme a pour effet de réorienter les chaînes latérales des résidus constituant le site actif et de les disposer de façon telle qu'ils deviennent catalytiquement actifs. De plus, ce nouveau site actif est isolé du milieu cellulaire aqueux. L'ATP est donc protégé de toute hydrolyse lors de la catalyse et, seul, le glucose est susceptible d'être phosphorylé. Une topologie identique à celle de l'hexokinase est rencontrée aussi dans l'actine et dans la protéine de choc thermique HSP 70.

Le domaine catalytique des sérine/thréonine protéine kinases, ainsi que celui des tyrosine protéine kinases, possède un site de liaison au Mg^{2+}-ATP où apparaît un core catalytique très conservé d'une quarantaine d'aminoacides (*Figure 6.10A*). La séquence consensus Gly-X-Gly-XX-Gly du motif de reploiement nucléotidique y est retrouvée. Cette triade de glycines qui, dans la sous-unité catalytique des protéine kinases cAMP dépendantes, inclut les résidus 50 à 55, se situe à l'extrémité du premier brin β. Elle est en contact étroit avec l'ATP, le premier résidu Gly étant proche du ribose et le second étant en regard du pyrophosphate terminal. Une valine, qui, dans la sous-unité catalytique des protéine kinases cAMP-dépendantes occupe la position 57, est, elle aussi, très conservée. Située très près de

Figure 6.10



la séquence consensus, elle pourrait contribuer au positionnement des glycines conservées. Enfin, une lysine invariante, qui, dans la sous-unité catalytique des protéine kinases cAMP-dépendantes, occupe la position 72, est un résidu très caractéristique du domaine catalytique. Située à l'extrémité du deuxième brin β où elle est proche des phosphoryles β et γ, elle pourrait être impliquée dans le transfert du groupe phosphate, peut-être en médiant un transfert de proton (*Figure 6.10B*).

LE COENZYME A

Le coenzyme A, souvent abrégé en CoA, est constitué d'une unité β-mercaptoéthylamine unie à une unité pantothénate, d'origine vitaminique B, unie elle-même à l'AMP par l'intermédiaire d'un groupe phosphate (*Figure 6.11*). Le sulfhydryle terminal est le site réactif ; il se lie aux groupes acyle par une liaison thioester pour donner un acyl CoA. Le $\Delta G°'$ de l'hydrolyse d'un acyl CoA est fortement négatif, de l'ordre de – 32 kJ mol^{-1} et les acyl CoA possèdent un potentiel de transfert de groupe élevé. Les acyl CoA transportent un groupe acyle activé de la même façon que l'ATP transporte un groupe phosphoryle activé.

LE THIAMINE PYROPHOSPHATE

Au sein des cellules, le thiamine pyrophosphate (TPP) dérive de la thiamine, la vitamine B1, par transfert enzymatique du groupe pyrophosphate de l'ATP (*Figure 6.12*). La thiamine est constituée d'un cycle pyrimidique et d'un cycle thiazole. Le cycle thiazole contient le site réactif. En effet, l'atome de carbone situé entre l'atome d'azote chargé positivement et le soufre est acide et le TPP s'ionise pour former un carbanion dipolaire stabilisé par résonance. Le proton dissocié est capté, lui, par un résidu basique de la protéine enzymatique. Le carbanion est alors capable d'attaquer le carbone du carbonyle des substrats spécifiques.

Le thiamine pyrophosphate est le coenzyme de nombreuses décarboxylases Dans la pyruvate décarboxylase (*Figure 6.13*), la réaction clé est l'attaque de l'atome de carbone du carbonyle du pyruvate par le carbanion du TPP. Elle est suivie par la décarboxylation non oxydative du pyruvate lié au coenzyme. Le thiamine pyrophosphate intervient aussi dans la décarboxylation des α-céto acides, tels que le pyruvate ou l'acétoglutarate. Il est enfin le groupe prosthétique des transcétolases de la voie des pentoses phosphate (p. 176).

LE PYRIDOXAL PHOSPHATE

Au sein des cellules, le pyridoxal 5'-phosphate (PLP) dérive de la pyridoxine ou du pyridoxal, qui sont des vitamines B6, par transfert enzymatique du groupe γ-phosphoryle de l'ATP. Le groupe aldéhyde est le site réactif.

Site réactif

Pyridoxine

Pyridoxal

Pyridoxal 5'-phosphate (PLP)

Figure 6.11

β-Mercaptoéthylamine
Pantothénate
AMP
Acylation
Site réactif

Figure 6.12

Thiamine (vitamine B_1)

Thiamine pyrophosphate (TPP)

Site réactif
Proton ionisable

Figure 6.13

CO_2

Pyruvate

Hydroxyéthylthiamine pyrophosphate (HETPP)

Acétaldéhyde

Le PLP est le groupe prosthétique de nombreux enzymes intervenant dans le métabolisme des aminoacides : transamination, désamination, décarboxylation, isomérisation, racémisation, éliminations ou substitutions au niveau des carbones β ou γ, entre autres ; il participe aussi au clivage phosphorolytique du glycogène.

Dans les enzymes du métabolisme des aminoacides où il intervient comme coenzyme, le PLP établit de nombreuses liaisons non covalentes avec la protéine enzymatique. De plus, son groupe aldéhyde forme une liaison covalente avec le groupe ε-amine d'un résidu lysine du site actif pour former une aldimine, encore appelée base de Schiff, qui présente un système de doubles liaisons conjuguées et une charge positive sur l'atome d'azote (*Figure 6.14A*).

L'étape initiale de toutes les réactions enzymatiques PLP-dépendantes est une transamination (*Figure 6.14B*) conduisant à la formation d'une nouvelle aldimine entre le PLP et le groupe α-amine de l'aminoacide impliqué et à la réapparition du groupe ε-amine du résidu lysine du site actif. Cette réaction de transfert passe par un intermédiaire diamine tétraédrique. Les enzymes PLP-dépendants labilisent l'une des trois liaisons partant de l'atome de carbone α de l'aminoacide impliqué dans la nouvelle imine. En effet, en raison de la présence d'une charge positive sur son atome d'azote, le groupe prosthétique protoné joue le rôle de trappe à électrons et stabilise les intermédiaires catalytiques chargés négativement ; en d'autres termes, il se comporte en catalyseur électrophile.

RÔLE DES COFACTEURS MÉTALLIQUES

Dès 1895, Gabriel Bertrand a montré que nombre de molécules protéiques contiennent des métaux et que l'activité de beaucoup d'enzymes, sans doute la majorité, est sensible à la présence d'ions, principalement de cations métalliques monovalents ou divalents. Parmi ceux-ci, certains se lient de façon assez lâche à la protéine ou à l'enzyme et agissent comme ions activateurs. Les plus fréquemment rencontrés et les plus importants sont K^+, Mg^{2+} et Ca^{2+}. Le potassium, le cation le plus abondant dans toutes les cellules, est indispensable à l'activité de plus d'une soixantaine d'enzymes dont il pourrait stabiliser la conformation active et/ou la liaison avec le substrat. Le magnésium se complexe avec l'ATP dans les ATPases. Le calcium se fixe réversiblement sur de très nombreuses protéines régulatrices ; parmi celles-ci, les protéines possédant un motif EF-hand, dont la calmoduline ubiquitaire est le modèle, et les annexines interviennent dans la modulation de nombreux processus.

Les métaux de transition tels que Fe, Co, Cu et Zn, dans leurs divers niveaux d'oxydation, se lient fermement aux protéines pour donner des métalloprotéines. Ils jouent un rôle très actif dans de nombreux métalloenzymes en formant des complexes enzyme-métal-substrat. Le fer fait partie intégrante de deux importantes familles de protéines susceptibles de transporter un électron, celle des protéines fer-soufre et celle des cytochromes.

Figure 6.14

(A)
$H_3\overset{\oplus}{N}$— $(CH_2)_4$— Lys
H
C=O
$^{2-}O_3POH_2C$
O⊖
N⊕
H
CH_3
H_2O
H_2O
Pyridoxal phosphate (PLP)
$(CH_2)_4$— Lys
H
C=N⊕
H
$^{2-}O_3POH_2C$
O⊖
N⊕
H
CH_3
Aldimine
(base de Schiff avec l'enzyme)
(B)
O
H
R
C
C
O⊖
α
Aminoacide
N
H
H
(CH_2) — Lys
H— C=N⊕
H
$^{2-}O_3POH_2C$
O⊖
N⊕
H
CH_3
Aldimine
(PLP-enzyme)
O
H
R
C
C
O⊖
H
$(CH_2)_4$— Lys
H— N
N⊕
C
H
H
$^{2-}O_3POH_2C$
O⊖
N⊕
H
CH_3
Diamine
(intermédiaire tétraédrique)
Aminotransférases
H
O
Aldolases
R— C— C— O⊖
Décarboxylases
H
C=N⊕
H
H_2N
$(CH_2)_4$— Lys
$^{2-}O_3POH_2C$
O⊖
N⊕
H
CH_3
Aldimine
(base de Schiff avec le substrat)

Dans les protéines fer-soufre, deux ou quatre atomes de fer sont liés à un nombre égal d'atomes de soufre inorganique ainsi qu'à quatre résidus cystéine pour former le centre fer-soufre 2Fe-2S (ou Fe_2S_2) (*Figure 6.15A*) ou 4Fe-4S (Fe_4S_4) (*Figure 6.15B*) de ces protéines. À un temps donné, certains atomes de fer du centre portent la charge + 2, d'autres la charge + 3, mais les électrons des orbitales les plus périphériques se déplacent rapidement d'un atome de fer à un autre et la charge réelle de chaque atome de fer se situe entre + 2 et + 3. Les centres fer-soufre acceptent réversiblement un seul électron à la fois, cet électron se répartissant sur l'ensemble des atomes de fer.

Dans les cytochromes, un atome de fer octaédrique est coordonné par quatre liaisons coplanaires aux quatre atomes d'azote d'une porphyrine pour constituer un groupe prosthétique dénommé hème. Les deux autres liaisons du fer, perpendiculaires aux précédentes, établissent des liaisons ou des interactions avec certains résidus de la protéine. Trois types d'hème, *a*, *b* et *c* (*Figure 6.15C*) sont rencontrés dans les cytochromes. Le fer transporte un seul électron à la fois en passant réversiblement de l'état oxydé ferrique Fe^{3+} à l'état réduit ferreux Fe^{2+}.

$$Fe^{3+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+}$$

L'hème de type *a* est rencontré dans les cytochromes *a* et a_3 de la cytochrome oxydase. L'hème de type *b* est trouvé dans les cytochromes *b*562 et *b*565 de la cytochrome réductase. L'hème de type *c* est présent dans les cytochromes *c* et c_1.

Outre le fer héminique, la cytochrome oxydase contient du cuivre. La cobalamine du coenzyme B12 possède du cobalt.

Plus de 300 enzymes où intervient le zinc, souvent sous forme de doigts de zinc (*Figure 6.15D*), ont été décrits. Parmi ces derniers, peuvent être cités les zinc protéases, telle la carboxypeptidase A, l'alcool déshydrogénase, l'anhydrase carbonique, et certains facteurs de régulation de la transcription, tels les récepteurs des hormones stéroïdes et des hormones thyroïdiennes.

Enfin, il faut considérer à part les métaux lourds, tels que le mercure ou le plomb qui sont non seulement des inhibiteurs mais des inactivateurs de la plupart des enzymes.



Figure 6.15

(A) Protéine 2 Fe-2 S
Cys
Cys
Cys
Cys
(B) Protéine 4 Fe-4 S
Cys
Cys
Cys
Cys
Fer
Soufre inorganique
Soufre des cystéines
(C)
Protéine
$H_2C-(CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2)_3-H$
HCOH
CH_3
H_3C
$CH=CH_2$
N
Fe
OHC
CH_3
CH_2
$^-O_2C-CH_2$
$CH_2-CO_2^-$
Hème de type *a*
Protéine
$H_2C=CH$
CH_3
H_3C
$CH=CH_2$
N
Fe
H_3C
CH_3
CH_2
$^-O_2C-CH_2$
$CH_2-CO_2^-$
Hème de type *b*
Protéine
CH_3
Cys −S− CH
H_3C
CH_3
CH_3
CH−S− Cys
N
Fe
H_3C
CH_3
CH_2
$^-O_2C-CH_2$
$CH_2-CO_2^-$
Hème de type *c*
(D)
←Chaîne polypeptidique
Type
Cys- Cys-Cys-Cys
Cys
Zn^{2+}
H_3^+N
CO_2^-
←Chaîne polypeptidique
Type
Cys-Cys- His-His
H
Cys
Zn^{2+}
H_3^+N
CO_2^-

Chapitre 7

Mécanismes de régulation de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique peut être affectée de façon spécifique par de nombreux agents chimiques. L'étude de ces effecteurs est importante. Elle permet d'analyser les processus enzymatiques et de comprendre certains aspects du mécanisme d'action des enzymes. De plus, nombre d'effecteurs jouent un rôle physiologique ou pharmacologique ; ainsi, d'importantes drogues, tels certains toxiques, antibiotiques ou antimitotiques, agissent spécifiquement sur certains systèmes enzymatiques. On peut distinguer deux types d'effecteurs, les inhibiteurs et les activateurs, mais tous agissent en se combinant soit avec l'enzyme, soit avec le complexe enzyme-substrat, soit avec le substrat lui-même. Selon que l'effecteur se combine avec l'un ou l'autre, que ces combinaisons sont indépendantes les unes des autres ou non, les systèmes enzyme plus substrat plus effecteur peuvent présenter des propriétés très variées et plus ou moins complexes. On distingue aussi les effets réversibles, indépendants du temps, et les effets irréversibles où l'effet s'accroît avec le temps de contact entre l'enzyme et l'effecteur et subsiste plus ou moins longtemps après élimination de l'effecteur. Lorsque l'effet d'un agent chimique sur un enzyme se traduit par une diminution de l'activité de ce dernier, on parle d'inhibition si l'effet est réversible ou d'inactivation s'il est irréversible. L'analyse cinétique est applicable à l'étude des effets réversibles qui se manifestent essentiellement par des variations apparentes des constantes d'affinité et d'activité. Elle n'est pas applicable à la description des effets irréversibles.

Par ailleurs, la cellule est un système chimique complexe entièrement automatisé. Les voies métaboliques produisent les biomolécules et l'énergie nécessaires à chacune des fonctions cellulaires et un réseau cybernétique assure la cohérence fonctionnelle de la machinerie chimique intracellulaire, les opérations élémentaires y étant assumées par des protéines spécialisées qui jouent le rôle de détecteurs et d'intégrateurs d'informations chimiques. Parmi ces protéines régulatrices, les plus importantes sont les enzymes allostériques, dont l'activité est modulée par la liaison non covalente réversible d'un ou de plusieurs autres composés sur des sites différents du site catalytique et les enzymes dont l'activité peut être modulée par une modification covalente réversible qui est le plus souvent une phosphorylation.

Enfin, certains enzymes sont synthétisés sous la forme d'un précurseur inactif, appelé zymogène, qui peut être activé lorsque les circonstances physiologiques sont appropriées. Certains enzymes, telles la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine, sont sécrétés sous forme de zymogènes inactifs dans le tube digestif avant d'y être activés par protéolyse d'une partie de leur chaîne polypeptidique. De même, dans la cascade enzymatique qui conduit à la formation d'un caillot sanguin, la forme activée d'un facteur de coagulation catalyse l'activation du suivant.

INHIBITION COMPÉTITIVE DES ENZYMES

Dans un système où un enzyme peut se combiner de façon réversible avec son substrat ou avec un inhibiteur pour former des complexes ES ou EI mutuellement exclusifs l'un de l'autre, ce qui est le cas lorsque l'inhibiteur peut prendre la place du substrat dans le centre catalytique de l'enzyme mais pas se fixer sur le complexe ES (*Figure 7.1A*), l'effet est une inhibition dite compétitive. En effet, elle dépend des concentrations relatives de substrat et d'inhibiteur et des affinités relatives de l'enzyme pour ces derniers ; l'augmentation de la concentration du substrat tend à annuler l'effet de l'inhibiteur.

Dans un tel système, seul le complexe ES évolue vers la formation d'un produit P. Le complexe EI est inactif et ne peut pas donner un composé qui résulterait de la transformation de I. Il ne s'établit donc que deux équilibres entre l'enzyme libre E_L, le substrat S, l'inhibiteur I, le complexe enzyme-substrat ES et le complexe enzyme-inhibiteur EI.

1) $$E_L + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_{cat}} P \quad \text{avec} \quad \frac{[E_L]\,[S]}{[ES]} = K_M$$

2) $$E_L + I \rightleftarrows EI \quad \text{avec} \quad \frac{[E_L]\,[I]}{[EI]} = K_I$$

où K_I est la constante de dissociation du complexe EI

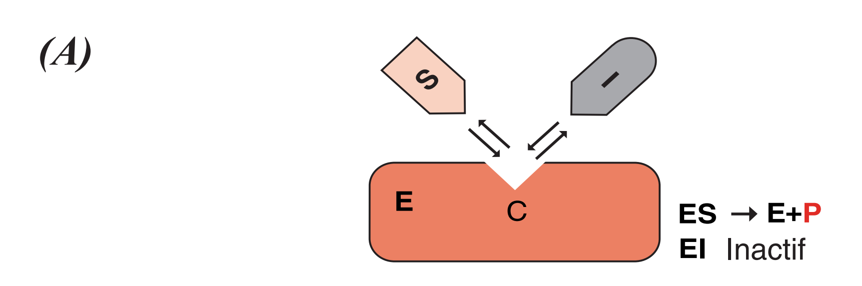
L'équation de vitesse s'écrit :

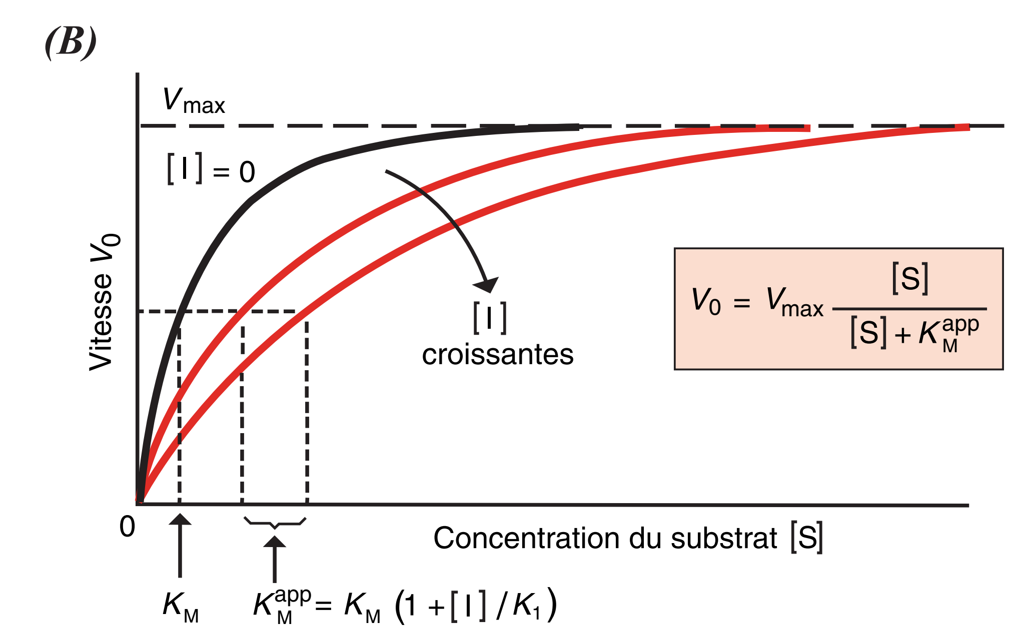
$$V_0 = V_{max}\frac{[S]}{[S] + K_M^{app}} = k_{cat}\,[E_T]\,\frac{[S]}{[S] + K_M^{app}} \quad \text{où} \quad K_M^{app} = K_M\,(\,1 + [I]\,/\,K_I\,)$$

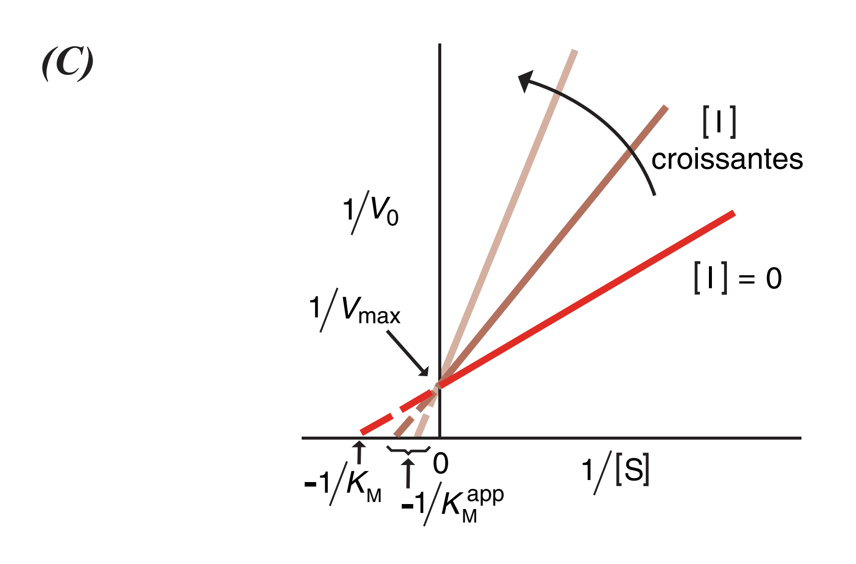
Ces équations sont identiques à celles de Michaelis-Menten, où K_M est remplacé par un K_M^{app} de valeur $K_M(1 + [I]/K_I)$. L'augmentation de la concentration d'un inhibiteur compétitif [I] se traduit par une augmentation du K_M^{app}. Par contre, la vitesse maximum V_{max} est inchangée. Aux concentrations élevées de substrat [S], la vitesse de la réaction s'approche de cette vitesse maximum V_{max}, comme s'il n'y avait pas d'inhibiteur (*Figure 7.1B*).

Pour une concentration donnée de I, selon la représentation de Lineweaver-Burk, la variation de $1/V_0$ en fonction de 1/[S] est linéaire (*Figure 7.1C*). Pour des concentrations croissantes de I, les droites obtenues coupent toutes l'axe des ordonnées au même point $1/V_{max}$, ce qui confirme que l'augmentation de la concentration du substrat vient à annuler l'effet de l'inhibiteur. Par contre, elles coupent l'axe des abscisses en des points $-1/K_M^{app}$ dont les valeurs absolues décroissent lorsque la concentration de I augmente. Ainsi, dans un système compétitif, la présence de l'inhibiteur se traduit par une variation apparente de la constante de Michaelis K_M, sans effet sur la vitesse maximum V_{max}.


Figure 7.1


(A)
S
I
E
C
ES → E+P
EI Inactif


(B)
V_{max}
[I] = 0
Vitesse V_0
[I]
croissantes
$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M^{app}}$
0
Concentration du substrat [S]
K_M
$K_M^{app} = K_M (1 + [I]/K_1)$


(C)
[I]
croissantes
$1/V_0$
[I] = 0
$1/V_{max}$
$-1/K_M$
0
$-1/K_M^{app}$
$1/[S]$

INHIBITION NON COMPÉTITIVE DES ENZYMES

Dans un système où un enzyme peut se combiner de façon réversible, indépendamment, avec son substrat S, au niveau de son centre catalytique, ou avec un inhibiteur I, au niveau d'un autre site, sans que la fixation de ce dernier modifie l'affinité de l'enzyme pour le substrat (*Figure 7.2A*), l'effet est une inhibition dite non compétitive, car elle n'est pas levée par l'addition de substrat.

Dans un tel système, seul le complexe ES évolue vers la formation d'un produit P. Les deux complexes EI et EIS sont inactifs. EIS ne peut pas conduire au produit P car la fixation de l'inhibiteur I sur l'enzyme empêche toute activité catalytique de ce dernier, vraisemblablement en modifiant la conformation de son site actif. Il s'établit quatre équilibres entre l'enzyme libre E_L, le substrat S, l'inhibiteur I, le complexe enzyme-substrat ES, le complexe enzyme-inhibiteur EI et le complexe enzyme-substrat-inhibiteur ESI.

1) $E_L + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{cat}} P \quad \text{avec} \quad \frac{[E_L][S]}{[ES]} = K_M$

2) $E_L + I \rightleftharpoons EI \quad \text{avec} \quad \frac{[E_L][I]}{[EI]} = K_I$

3) $EI + S \rightleftharpoons ESI \quad \text{avec} \quad \frac{[EI][S]}{[ESI]} = K_M$

4) $ES + I \rightleftharpoons ESI \quad \text{avec} \quad \frac{[ES][I]}{[ESI]} = K_I$

où K_I est la constante de dissociation du complexe EI.

L'équation de vitesse s'écrit :

$$V_0 = V_{max}^{app} \bullet \frac{[S]}{[S] + K_M} = k_{cat}^{app}[E_T] \bullet \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

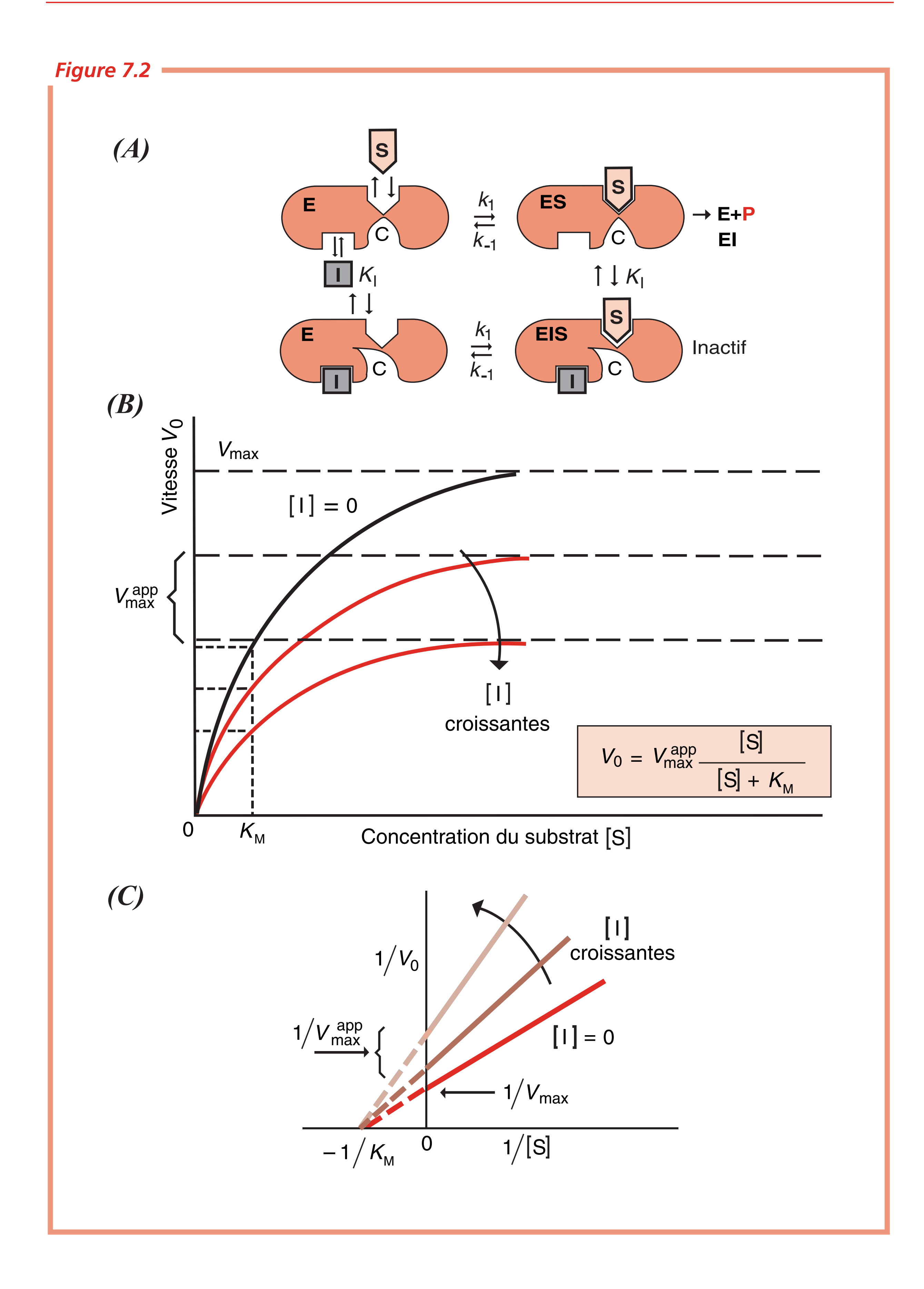
où

$$V_{max}^{app} = k_{cat}^{app}[E_T] \quad \text{et} \quad k_{cat}^{app} = k_{cat} / (1 + [I]\ K_I)$$

Ces équations sont identiques aux équations de Michaelis-Menten, où V_{max} est remplacé par un V_{max}^{app} et k_{cat} par un k_{cat}^{app} de valeur $k_{cat}/(1 + [I]/K_I)$. L'augmentation de la concentration d'un inhibiteur non compétitif [I] se traduit par une diminution du k_{cat}^{app} et donc de V_{max}^{app}. Par contre, la constante de Michaelis K_M est inchangée (*Figure 7.2B*).

Pour une concentration donnée de I, selon la représentation de Lineweaver-Burk, la variation de $1/V_0$ en fonction de 1/[S] est linéaire (*Figure 7.2C*). Pour des concentrations croissantes de I, les droites obtenues coupent l'axe des ordonnées en des points $1/V_{max}^{app}$ dont les valeurs croissent lorsque la concentration de I augmente. Par contre, elles coupent toutes l'axe des abscisses au même point $-1/K_M$. Ainsi, dans un système non compétitif, la présence de l'inhibiteur se traduit par une variation apparente de la vitesse maximum V_{max}, sans effet sur la constante de Michaelis K_M. L'inhibition non compétitive pure est rarement rencontrée. Le plus souvent, le phénomène est plus complexe et il apparaît une inhibition mixte où le complexe ESI peut évoluer vers une transformation lente du substrat S en produit P ou encore où k_{cat} et K_M sont tous deux affectés.

Figure 7.2


(A)
S
E
C
k_1
k_{-1}
ES
S
C
→ E+P
EI
I
K_I
K_I
E
C
I
k_1
k_{-1}
EIS
S
C
I
Inactif
(B)
Vitesse V_0
V_{max}
[I] = 0
V_{max}^{app}
[I]
croissantes
$V_0 = V_{max}^{app} \frac{[S]}{[S] + K_M}$
0
K_M
Concentration du substrat [S]
(C)
$1/V_0$
[I]
croissantes
$1/V_{max}^{app}$
[I] = 0
$1/V_{max}$
$-1/K_M$
0
$1/[S]$

INHIBITION INCOMPÉTITIVE DES ENZYMES

Dans un système où l'inhibiteur se combine de façon réversible exclusivement au complexe enzyme-substrat ES (*Figure 7.3A*), l'effet est une inhibition dite incompétitive. Elle n'est pas levée par l'addition de substrat.
L'équation de vitesse s'écrit :

$$V_0 = k_{cat}\,[E_T]\,\frac{[S]}{[S]\,(1 + [I]/K_I) + K_M}$$

L'augmentation de la concentration d'un inhibiteur incompétitif [I], qui déplace l'équilibre pour la formation de ES et de ESI inactif en faveur de ce dernier, se traduit par une diminution de K_M et de k_{cat}, et donc de V_{max} (*Figure 7.3B*).

Pour une concentration donnée de I, selon la représentation de Lineweaver-Burk, la variation de $1/V_0$ en fonction de 1/[S] est linéaire (*Figure 7.3C*). Pour des concentrations croissantes de I, les droites obtenues sont parallèles, ce qui indique des décroissances proportionnelles de K_M et de V_{max}. L'inhibition incompétitive est rare dans les systèmes qui n'impliquent qu'un seul substrat. Elle est plus fréquente dans les systèmes à substrats multiples.

INHIBITION PAR EXCÈS DE SUBSTRAT

Dans certains systèmes, le substrat, lorsqu'il est relativement concentré, entre en compétition avec lui-même, en formant avec le récepteur enzymatique des liaisons incomplètes. C'est le cas, par exemple, pour l'hydrolyse de l'acétylcholine par la cholinestérase (*Figure 7.4A*). Dans le complexe actif, le substrat est lié par deux groupes de l'acétylcholine : (A), $(CH_3)_3–N^+$, et (E), O–C = O, aux sites anionique (A') et catalytique (estérasique) (E') de l'enzyme, respectivement. Lorsque chacun de ces groupes appartient à une molécule différente, les sites sont occupés mais le complexe est inactif. L'effet se manifeste par une déviation par rapport à la loi de Michaelis-Menten ; la vitesse de réaction ne tend plus vers une asymptote lorsque la concentration de substrat augmente, mais passe par un maximum, puis diminue (*Figure 7.4B*).

Figure 7.4

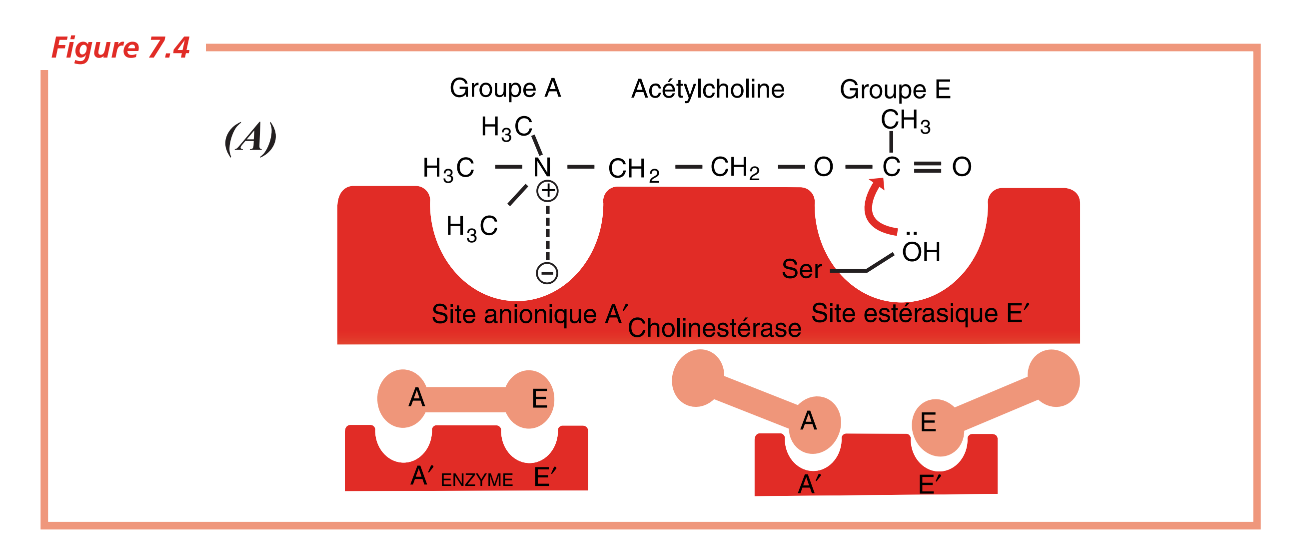


Figure 7.3

(A)

E C + S ⇄ ES C S I → E+P EIS C S I Inactif

(B)

V_{max}

Vitesse V_0

V_{max}^{app}

[I] = 0

[I] croissantes

$$V_0 = k_{cat}\,[E_T]\,\frac{[S]}{[S](1 + [I]/K_I) + K_M}$$

0

K_M^{app} K_M

Concentration du substrat [S]

(C)

$1/V_0$

[I] croissantes

[I] = 0

$1/V_{max}^{app}$

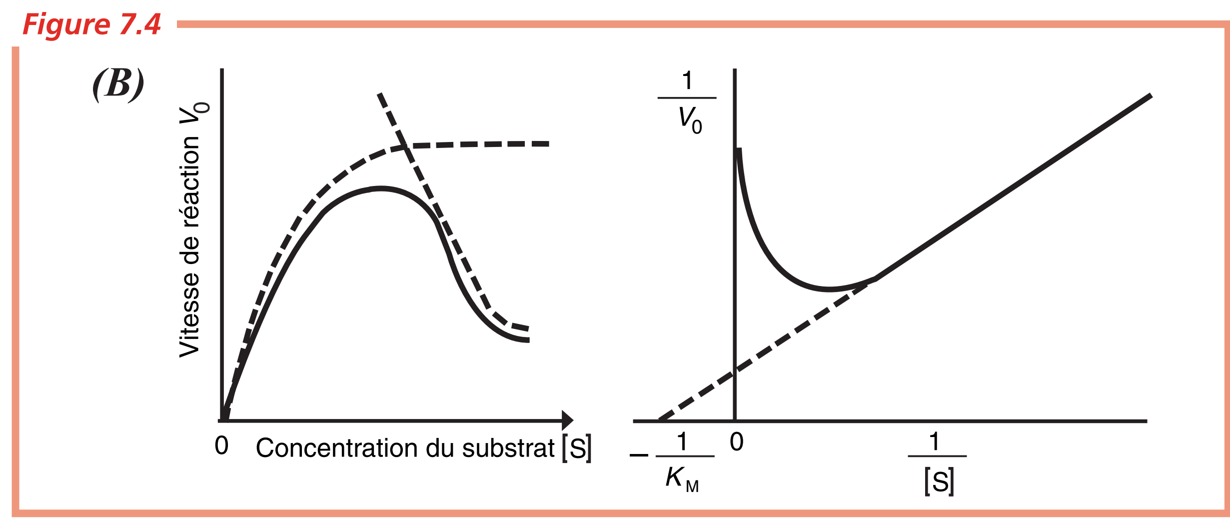
$\frac{1}{V_{max}}$

0

$1/[S]$

$-1/K_M^{app}$ $-1/K_M$

Figure 7.4



INACTIVATION DES ENZYMES

Des enzymes peuvent se combiner à des substances avec lesquelles ils forment des liaisons covalentes. Lorsque cette combinaison se fait au niveau du site actif, il en résulte une perte, le plus souvent irréversible, ou du moins très difficilement réversible, de l'activité enzymatique, dite inactivation. Ces substances, naturelles ou de synthèse, peuvent être des toxiques puissants.

Les ions cyanure CN^- se complexent avec les ions métalliques (Fe, Zn, Cu) de certains enzymes. Le diisopropyl fluorophosphate (DIFP) et les gaz de combat qui en dérivent, tel le sarin, réagissent très rapidement et de façon très difficilement réversible avec les hydroxyles des résidus sérine, y compris ceux qui sont essentiels à l'activité des sites catalytiques. En particulier, ils inactivent totalement les sérine estérases et les sérine protéases (*Figure 7.5A*). Ainsi, la cholinestérase, qui joue un rôle essentiel dans la conduction de l'influx nerveux, est totalement inactivée par le DIFP ou le sarin, avec pour conséquence une paralysie des fonctions vitales. De même, la chymotrypsine, sérine-protéase du suc digestif pancréatique, est complètement inactivée par le DIFP qui réagit avec la sérine 195 de son site actif. Certains inhibiteurs irréversibles peuvent être extrêmement sélectifs. Ainsi, la tosyl-L-phénylalanine-chlorométhyl cétone (TPCK) (*Figure 7.5B*) est un inhibiteur très spécifique de la chymotrypsine car son groupe phényle s'adapte à la cavité du site actif et place le chlore en position favorable pour réagir avec le cycle imidazole de l'histidine 57.

DES INHIBITEURS DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE SONT DES RÉACTIFS BIOCHIMIQUES OU DES MÉDICAMENTS PUISSANTS ET PRÉCIEUX

Toute réaction enzymatique évolue en deux étapes :

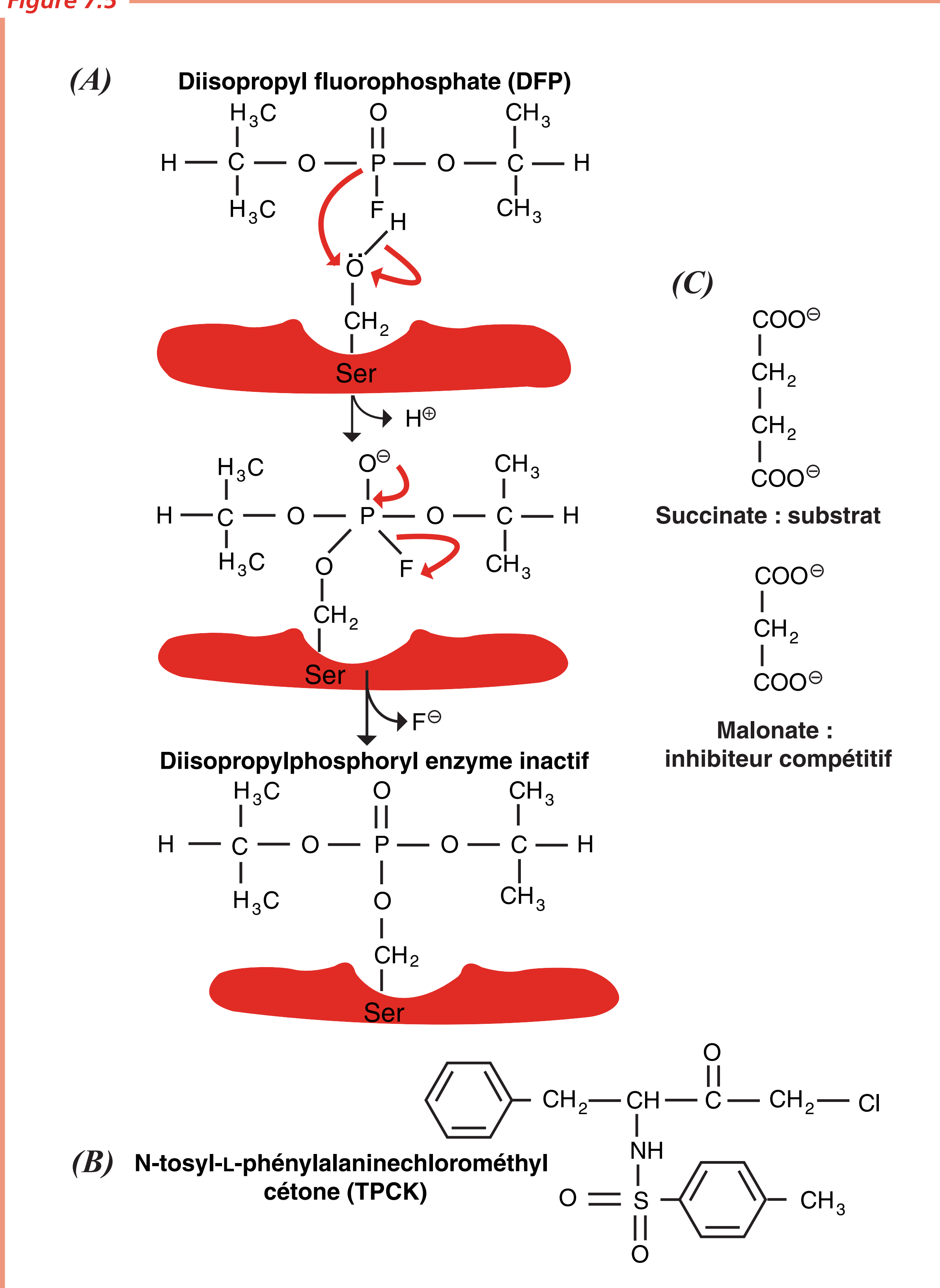
$$E + S \rightleftharpoons ES \dashrightarrow E + P$$

On conçoit que certaines substances puissent franchir la première, mais non la seconde. En prenant la place du substrat dans le complexe ES, elles se comportent en inhibiteurs compétitifs. Étant donnée la stéréospécificité du site actif des enzymes, ces inhibiteurs doivent présenter une étroite analogie de structure avec le substrat. Un très grand nombre de cas d'inhibition d'une réaction enzymatique par un analogue stérique du substrat normal sont connus.

Le produit, ou du moins l'un des produits de la réaction enzymatique, a en général une structure proche de celle du substrat lui-même et il se comporte souvent comme un inhibiteur compétitif.

Le malonate, qui ne diffère du succinate que par la présence d'un méthylène au lieu de deux (*Figure 7.5C*), est un inhibiteur compétitif de la succinate déshydrogénase, bien qu'il ne soit pas déshydrogénable par cet enzyme.

Figure 7.5


(A)
Diisopropyl fluorophosphate (DFP)
H₃C
O
CH₃
H — C — O — P — O — C — H
F
H
Ö
CH₂
Ser
H⊕
O⊖
F
Ser
F⊖
Diisopropylphosphoryl enzyme inactif
Ser
(B)
N-tosyl-L-phénylalaninechlorométhyl cétone (TPCK)
CH₂— CH — C — CH₂— Cl
NH
O = S
CH₃
(C)
COO⊖
CH₂
CH₂
COO⊖
Succinate : substrat
COO⊖
CH₂
COO⊖
Malonate :
inhibiteur compétitif

L'UpA est un excellent substrat de la ribonucléase. L'UpcA, qui ne diffère de l'UpA que par la présence d'un méthylène à la place de l'oxygène au niveau du site de clivage, formant ainsi un analogue phosphonate, est un inhibiteur compétitif puissant de cette même ribonucléase (*Figure 7.6A*).

Le folate est indispensable à la croissance et à la prolifération cellulaire. Chez les Bactéries, ce dernier est formé par l'union de la ptérine, du *p*-aminobenzoate et du glutamate. Les Vertébrés ont perdu l'équipement enzymatique nécessaire à cette biosynthèse et, chez eux, le folate doit être apporté par l'alimentation. Le sulfanilamide (*Figure 7.6B*) et certains de ses dérivés, les sulfamides, qui sont des analogues structuraux du *p*-aminobenzoate, entrent en compétition avec ce dernier dans la biosynthèse du folate par les Bactéries. Les sulfamides, qui donc interfèrent sélectivement avec le métabolisme de ces dernières, sont largement utilisés en thérapeutique anti-infectieuse.

Le désoxyuridylate (dUMP) et son dérivé méthylé le désoxythymidylate (dTMP) sont indispensables à la synthèse du DNA dans les cellules en division rapide (p. 348). Le fluorouracile, analogue stérique du dUMP (*Figure 7.6C*), forme un complexe covalent avec un résidu sulhydryle du site actif de la thymidylate synthase et le méthylènetétrahydrofolate. La catalyse reste bloquée au niveau de ce complexe, ce qui donc inhibe irréversiblement l'enzyme. Une telle inhibition est dite suicidaire car l'enzyme se tue lui-même en fixant un analogue qui, après s'être transformé, se lie irréversiblement à lui.

Des analogues du dihydrofolate, l'aminoptérine et l'améthoptérine (ou méthotrexate) (*Figure 7.6D*), sont des inhibiteurs compétitifs puissants ($K_I < 10^{-9}$) de la dihydrofolate réductase. La thymidylate synthase et la dihydrofolate réductase, enzymes essentiels dans la biosynthèse du dUMP et du dTMP (p. 314), sont des cibles d'élection dans la chimiothérapie anticancéreuse.

Figure 7.6

(A)

UpA : substrat

UpcA : inhibiteur compétitif

Figure 7.6

(B)

H_2N–C₆H₄–COOH

***p*-Aminobenzoate : substrat**

H_2N–C₆H₄–$SO_2(NH_2)$

Sulfanilamide : compétiteur

(C)

5-Fluorouracile

HS — Thymidylate synthase

S — Thymidylate synthase

Méthylène THF

THF, CH_2

S — Thymidylate synthase

Complexe d'addition stable

(D)

Aminoptérine (R = H) Améthoptérine (R = CH_3)

ENZYMES ALLOSTÉRIQUES

Dans la plupart, sinon dans toutes les voies du métabolisme, un certain nombre d'enzymes en position clé ont leur activité gouvernée par la concentration de leurs substrats selon une cinétique différente de la cinétique michaelienne. La courbe donnant la variation de V_0 en fonction de [S] n'est plus de type hyperbolique, mais de type sigmoïde (*Figure 7.7A*) et, en coordonnées réciproques donnant la variation de $1/V_0$ en fonction de 1/[S], la courbe n'est plus une droite (*Figure 7.7B*).

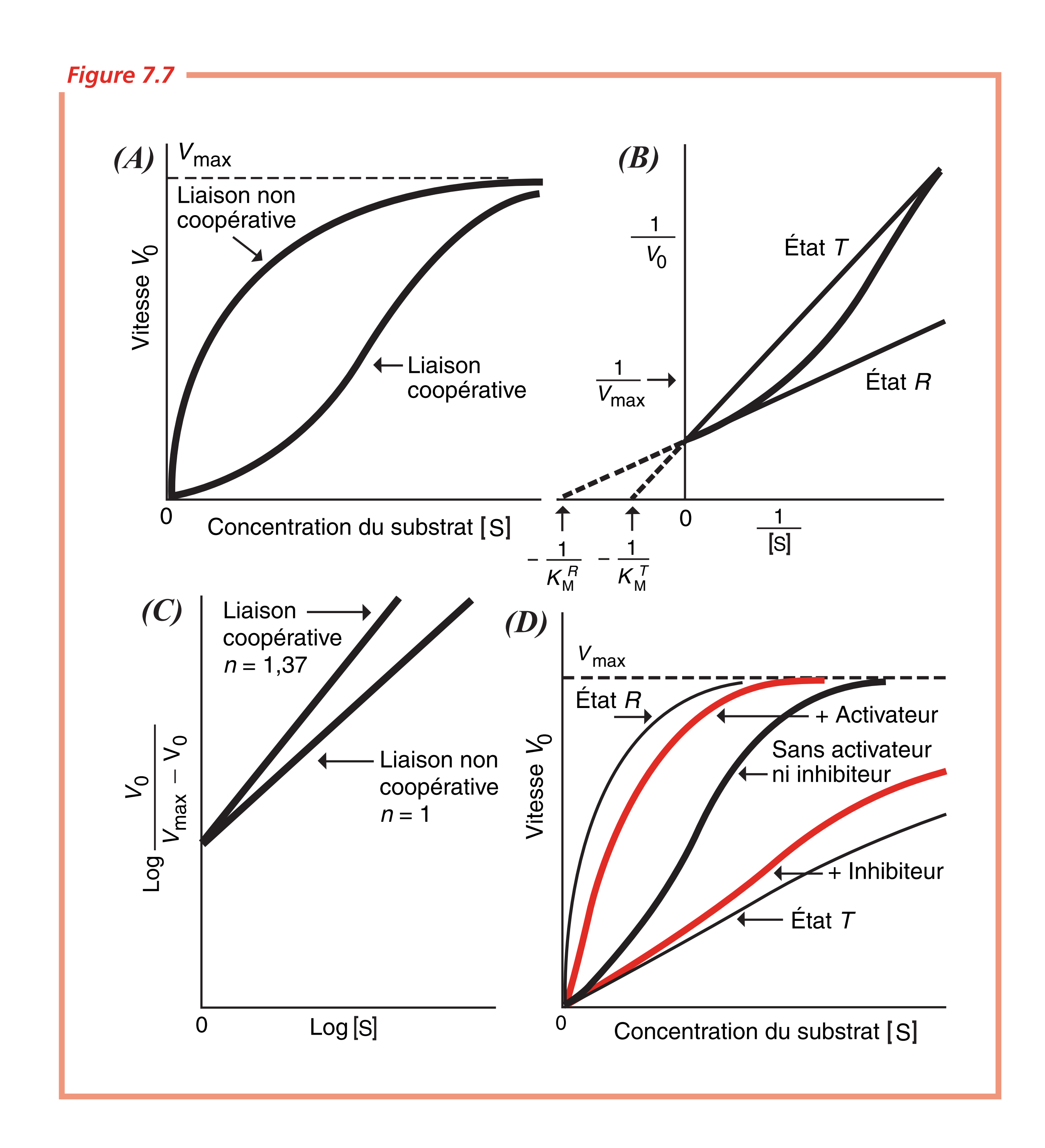
De telles courbes traduisent un phénomène coopératif réversible entre plusieurs récepteurs pour le substrat, la fixation d'une molécule de substrat sur un récepteur modifiant l'affinité des autres pour ce même substrat. L'existence d'un tel phénomène implique donc que les récepteurs soient portés par une protéine susceptible d'exister, selon le modèle MWC, dans deux états *T* et *R*, en équilibre. La représentation de Hill, où $\log_e V_0/V_{max} - V_0$ est exprimé en fonction de $\log_e$ [S] (*Figure 7.7C*), donne une courbe en S dont la partie centrale est assimilable à une droite de pente *n*, *n* étant une caractéristique du système reliée indirectement au nombre de récepteurs par molécule d'enzyme, et donc toujours supérieure à 1.

Par ailleurs, caractéristique fondamentale de ces enzymes, leur activité est gouvernée, non seulement par la concentration de leurs substrats, mais aussi par celle d'autres métabolites qui souvent sont des produits plus ou moins différents de ceux de la voie métabolique à laquelle ils participent, ou d'une voie parallèle (*Figure 7.7D*). Ainsi, l'aspartate transcarbamylase est le premier enzyme d'une voie conduisant en six étapes à la synthèse du cytidine triphosphate (CTP) ; elle est inhibée par ce dernier. La thréonine désaminase intervient dans la première réaction de la voie conduisant de la thréonine à l'isoleucine ; elle est inhibée par cette dernière. L'aspartokinase est le premier enzyme d'une voie branchée conduisant à la lysine d'une part, à la thréonine de l'autre ; chez *Escherichia Coli*, il existe deux aspartokinases dont l'une est inhibée par la lysine et l'autre par la thréonine. Tous ces enzymes possèdent donc la propriété d'être inhibés de façon réversible, et pour la plupart compétitivement, c'est-à-dire avec une variation de la constante d'affinité apparente pour leur substrat, par des produits qui n'ont pas d'analogie stérique avec leurs substrats. Le qualificatif « allostérique » caractérise ce type d'inhibition.

Presque tous ces enzymes présentent, à côté d'effets inhibiteurs allostériques, des effets activateurs réversibles de même type. Ainsi, l'aspartate transcarbamylase, inhibée par le CTP, est activée spécifiquement par l'ATP. La thréonine désaminase, inhibée par l'isoleucine, est activée par la valine. Ces observations ont conduit, avec d'autres faits, à la conclusion que les effets inhibiteurs ou activateurs dont ces enzymes sont l'objet, sont dus à des interactions indirectes entre récepteurs stéréospécifiques distincts portés par la même molécule.

Les enzymes allostériques sont donc nécessairement des protéines constituées de plusieurs sous-unités possédant plusieurs types de récepteurs. De plus, leur molécule présente souvent des éléments de symétrie. La liaison coopérative des enzymes allostériques avec leurs substrats est due à des interactions homotropiques entre sites catalytiques identiques portés par des sous-unités différentes. Elle conduit à une régulation homoallostérique dont la conséquence est une très faible activité enzymatique en deçà d'un certain seuil de concentration des substrats et une très forte activité au-delà. Les substrats peuvent s'accumuler dans la cellule tant que leur concentration reste inférieure au seuil d'activité de l'enzyme ;

Figure 7.7



dès que ce seuil est atteint, ils sont rapidement métabolisés. La régulation homoallostérique gouverne donc l'engagement des métabolites dans une voie de biosynthèse ou de dégradation. La modulation de l'activité des enzymes allostériques par des activateurs ou des inhibiteurs autres que les substrats est due à des interactions hétérotropiques entre sites catalytiques et sites récepteurs des molécules régulatrices qui permettent d'accorder entre elles les activités des différentes voies de biosynthèse ou de dégradation. La modulation hétéroallostérique contribue donc à l'intégration du métabolisme.

L'ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE : EXEMPLE D'UN ENZYME ALLOSTÉRIQUE

L'aspartate transcarbamylase (ATCase), connue aussi sous le nom d'aspartate carbamyltransférase, est un bon exemple d'enzyme allostérique. Chez les Bactéries entériques, telles que *Escherichia coli*, cet enzyme engage le carbamyl phosphate et l'aspartate dans la voie de biosynthèse des nucléotides pyrimidiques (*Figure 7.8A*).

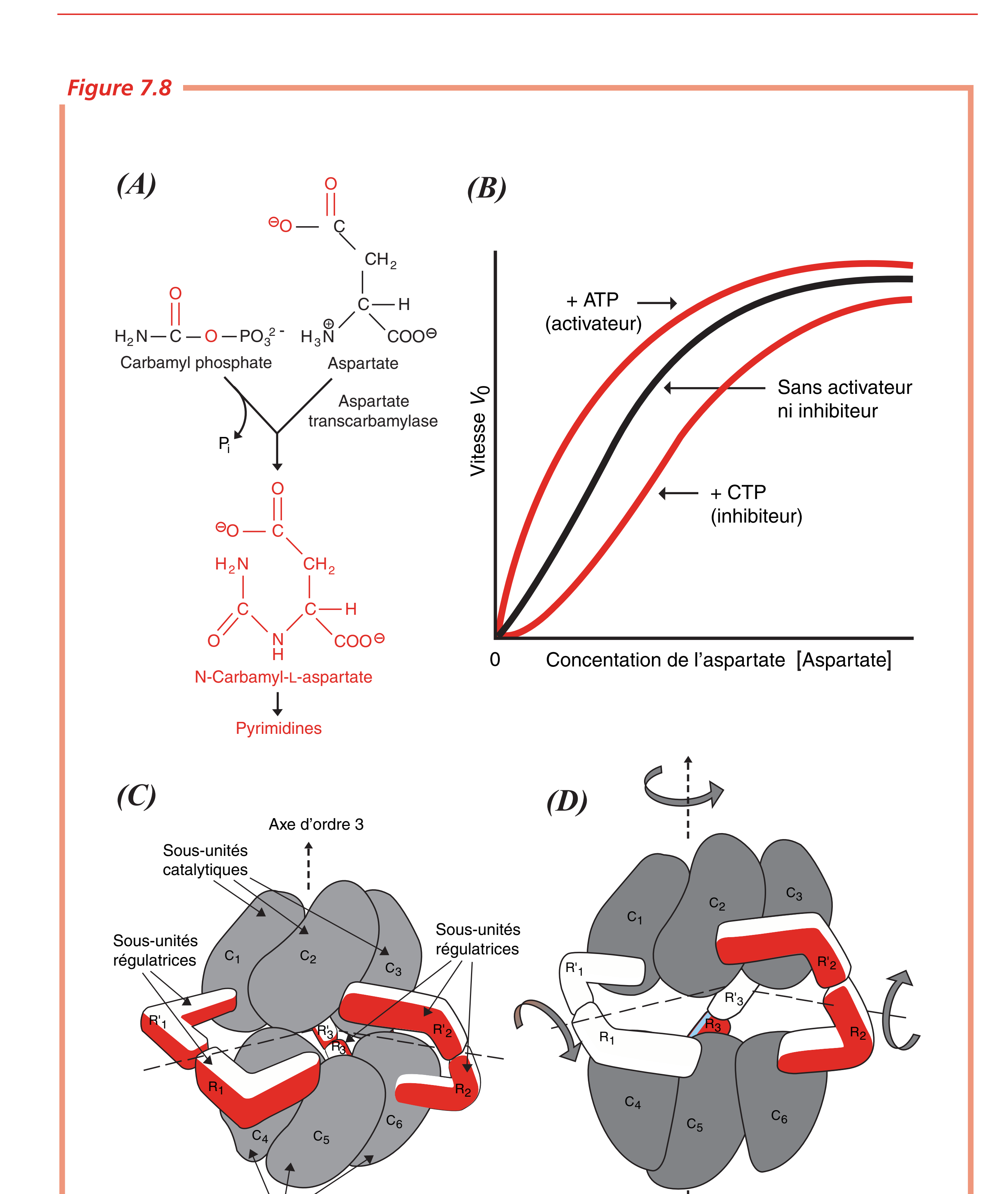
La liaison coopérative du carbamyl phosphate et de l'aspartate permet de déclencher la synthèse du *N*-carbamyl L-aspartate dans une zone de concentrations en substrats assez étroite (*Figure 7.8B*). De plus, l'enzyme est inhibé par le CTP, produit final de la voie, qui diminue son affinité pour les substrats sans affecter V_{max}. Il est activé par l'ATP qui augmente son affinité pour les substrats, toujours sans modifier V_{max}. Ces deux réponses sont coordonnées physiologiquement. La rétroinhibition par le CTP assure que lorsque la cellule possède des taux élevés de nucléotides pyrimidiques, ces derniers ne seront pas synthétisés en excès. L'activation par l'ATP, nucléotide qui reflète l'état énergétique de la cellule, signale que de l'énergie est disponible pour la réplication du DNA et conduit aux nucléotides pyrimidiques nécessaires à cette biosynthèse.

L'ATCase est une protéine multisous-unitaire. Sa structure quaternaire montre qu'elle est constituée de six sous-unités catalytiques réparties en deux groupes de trois et maintenues ensemble par six sous-unités régulatrices réparties en trois groupes de deux (*Figure 7.8C*). Les sites de liaison des substrats sont situés sur les sous-unités catalytiques. Chaque sous-unité régulatrice a un site qui peut fixer le CTP ou l'ATP. Ces deux nucléotides entrent donc en compétition pour le même site et l'activité de l'ATCase est alors régulée par le rapport des concentrations cellulaires de CTP et d'ATP. Un réarrangement de la disposition des sous-unités a lieu lors de la transition de l'état *T* vers l'état *R*, ou inversement (*Figure 7.8D*).

MODIFICATION COVALENTE DES ENZYMES

La régulation fine du métabolisme ne s'effectue pas uniquement par la modulation de l'activité d'enzymes allostériques en position clé au début des voies de biosynthèse ou de dégradation. Elle fait aussi appel à un mécanisme très différent qui consiste en une modification covalente réversible qui transforme un enzyme totalement inactif, ou du moins très peu actif, en un enzyme pleinement actif, ou, à l'inverse, un enzyme actif en un enzyme inactif. Parmi ces modifications covalentes, la phosphorylation réversible par des protéine kinases et des phosphatases, qui assure la modulation de l'activité de nombreux enzymes, n'est qu'un aspect particulier de la phosphorylation des protéines, réaction biochimique ubiquitaire et très fréquemment mise à profit dans la dynamique cellulaire.

Figure 7.8


(A)
Carbamyl phosphate
Aspartate
Aspartate transcarbamylase
N-Carbamyl-L-aspartate
Pyrimidines
(B)
+ ATP (activateur)
Sans activateur ni inhibiteur
+ CTP (inhibiteur)
Vitesse V0
0
Concentation de l'aspartate [Aspartate]
(C)
Axe d'ordre 3
Sous-unités catalytiques
Sous-unités régulatrices
Sous-unités régulatrices
Sous-unités catalytiques
État T
(D)
État R

LES PROTÉINE KINASES

Les protéine kinases catalysent la phosphorylation des protéines. Elles constituent une famille d’enzymes de structure modulaire très diverse dont la composition sous-unitaire éventuelle, la spécificité de substrat, le mécanisme d’action et la localisation cellulaire varient très largement. Elles se répartissent dans deux classes : les sérine/thréonine kinases qui transfèrent un phosphate sur un résidu sérine ou thréonine et les tyrosine kinases qui transfèrent un phosphate sur un résidu tyrosine.

Parmi les très nombreuses protéine kinases connues, la protéine kinase cAMP-dépendante est une des mieux étudiées (*Figure 7.9A*). En l’absence de cAMP, elle se présente sous la forme d’un tétramère inactif constitué de deux sous-unités catalytiques (C) et de deux sous-unités régulatrices (R). Lorsque le taux de cAMP intracellulaire est élevé, deux molécules de ce nucléotide cyclique se lient avec une forte affinité sur chaque sous-unité R, ce qui a pour effet de diminuer l’affinité de ces dernières pour les sous-unités C d’un facteur 10^4. Il en résulte la dissociation de la protéine kinase cAMP-dépendante en un dimère R_2 $(cAMP)_4$ et deux sous-unités C libres catalytiquement actives.

Toutes les protéine kinases ont évolué chez les Eucaryotes à partir d’un core catalytique conservé et présentent donc, en dépit de leur diversité, un certain nombre de caractères structuraux secondaires ou tertiaires communs (*Figure 7.9B*). Les régions non catalytiques jouent des rôles importants dans la localisation cellulaire et dans l’activation et la régulation de l’activité de ces enzymes qui est rigoureusement contrôlée.

ACTIVATION DES PROENZYMES

De nombreux enzymes sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs appelés proenzymes, ou parfois zymogènes. Ils sont ensuite activés par hydrolyse spécifique irréversible d’une ou de quelques liaisons peptidiques. L’activation des proenzymes, qui est irréversible, est donc très différente de la régulation de l’activité des enzymes allostériques ou des enzymes phosphorylables qui est réversible. De plus, elle ne nécessite pas d’apport énergétique et peut donc s’effectuer en dehors des cellules.

L’activation des enzymes par protéolyse spécifique est mise à profit dans de nombreux processus biologiques. La digestion des protéines alimentaires est assumée par la pepsine du suc digestif de l’estomac, la trypsine, la chymotrypsine, la carboxypeptidase et l’élastase du suc digestif du pancréas, enzymes actifs dont les précurseurs inactifs sont le pepsinogène, le trypsinogène, le chymotrypsinogène, la procarboxypeptidase et la proélastase, respectivement. Ainsi, la chaîne polypeptidique du chymotrypsinogène, le précurseur inactif de la chymotrypsine, est constituée de 245 aminoacides. Au cours de l’activation du chymotrypsinogène, les résidus 14-15 et 147-148 sont excisés et les trois chaînes polypeptidiques résultantes restent liées l’une à l’autre par des liaisons S-S pour former la molécule de chymotrypsine active.

La coagulation du sang résulte d’une cascade d’activations protéolytiques qui assure une réponse amplifiée et rapide aux traumatismes qui entraînent une hémorragie. L’activation de proenzymes inactifs en enzymes actifs intervient aussi dans de nombreux processus développementaux ou évolutifs : celle de la procollagénase en collagénase lors de la métamorphose

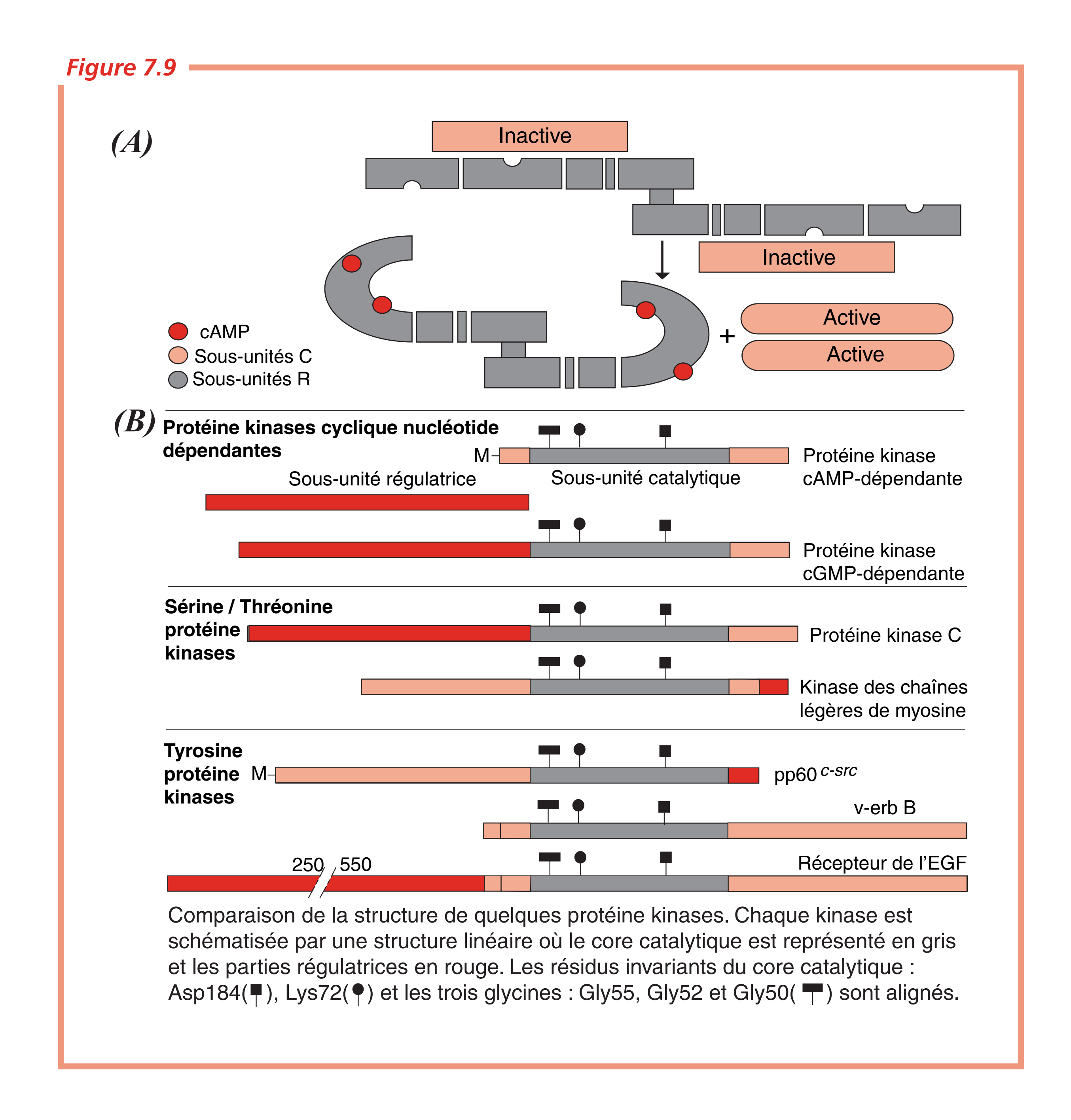


Figure 7.9

Comparaison de la structure de quelques protéine kinases. Chaque kinase est schématisée par une structure linéaire où le core catalytique est représenté en gris et les parties régulatrices en rouge. Les résidus invariants du core catalytique : Asp184(■), Lys72(●) et les trois glycines : Gly55, Gly52 et Gly50(▀) sont alignés.

des Amphibiens ou du remodelage de l'utérus des Mammifères après l'expulsion du fœtus, ou encore celle de la prococonase en coconase lors du développement de certains Insectes.

Le processus de régulation d'une propriété ou d'une activité biologique par activation irréversible d'un précurseur n'est pas particulier aux enzymes. Il est retrouvé, par exemple, dans la formation du collagène insoluble à partir du procollagène soluble ou dans l'activation d'une prohormone, telle la proinsuline, en hormone active, l'insuline.

PARTIE III

ÉNERGIE CELLULAIRE CONVERSION ET MISE EN RÉSERVE

Un apport continu d'énergie directement utilisable est indispensable aux êtres vivants pour effectuer des actes fondamentaux tels que la synthèse de biomolécules à partir de précurseurs simples, le transport actif d'ions et de molécules, les mouvements cellulaires, la reproduction. Dans la plupart de ces processus, le donneur d'énergie est l'adénosine triphosphate (ATP) dont l'énergie contenue dans ses deux dernières liaisons phosphate est d'utilisation quasi universelle. Pour synthétiser l'ATP, les êtres vivants mettent en œuvre trois mécanismes essentiels : la phosphorylation au niveau du substrat, la phosphorylation oxydative et la photophosphorylation, qui se développent au cours de trois processus fondamentaux : la fermentation, la respiration et la photosynthèse, respectivement.

Lors de la phosphorylation au niveau du substrat, la synthèse d'ATP résulte de la fixation d'un phosphoryle de haut potentiel de transfert sur l'ADP grâce à des enzymes cytosoliques solubles. Dans les cellules animales, de tels phosphoryles sont créés essentiellement au cours du métabolisme anaérobie des oses.

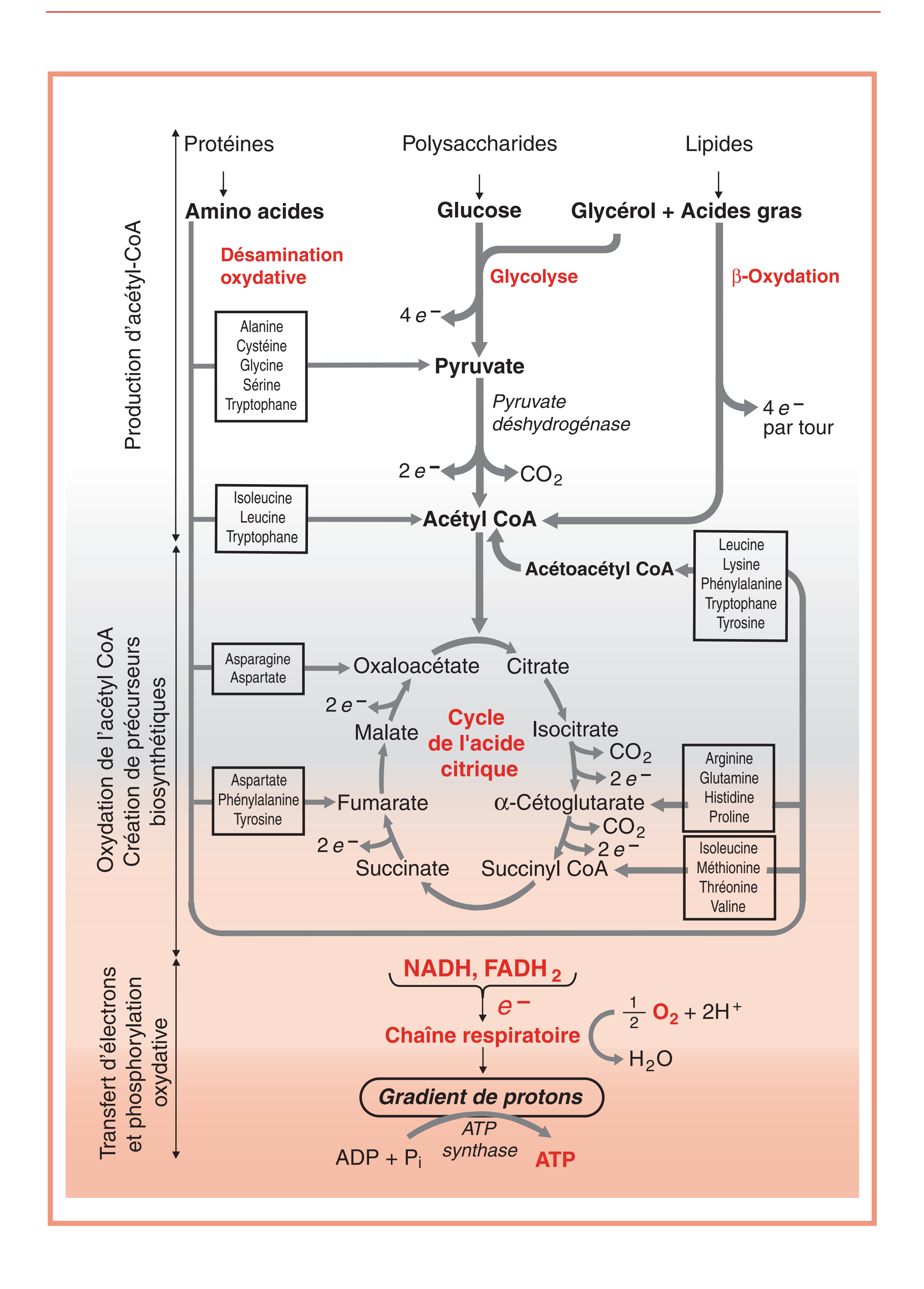
Lors de la phosphorylation oxydative et de la photophosphorylation, la synthèse d'ATP est réalisée à partir d'ADP et de P_i par une ATP synthase, avec pour source d'énergie une force protomotrice constituée d'un potentiel électrique de membrane et d'un gradient de concentration de protons. Pour créer cette force protomotrice, les cellules doivent disposer de structures constituées d'une membrane imperméable aux protons qui délimitent un compartiment clos et de pompes à protons. L'énergie nécessaire à l'activation de ces dernières est apportée par l'oxydation de certains métabolites lors de la phosphorylation oxydative ou par la capture de l'énergie lumineuse lors de la photophosphorylation. Les ATP synthases ont une grande unité de structure et sont très semblables dans l'ensemble des cellules bactériennes, animales ou végétales, mais les pompes à protons diffèrent selon les sources d'énergie et les espèces. Au début des années 1960, Peter Mitchell a montré que la phosphorylation oxydative et la photophosphorylation relèvent toutes deux d'un processus chimiosmotique qui, dans son essence, est le même chez les bactéries aérobies et dans les mitochondries et les chloroplastes des Eucaryotes. L'apparition du processus chimiosmotique a été parmi les premiers événements majeurs qui ont permis le développement des êtres vivants.

Par ailleurs, lorsque la biosynthèse d'une molécule fait intervenir un précurseur plus oxydé que le produit, un pouvoir réducteur est nécessaire. Pour l'essentiel, ce dernier est apporté par le NADPH qui est un transporteur d'électrons activés cyclant entre une forme réduite et une forme oxydée. Le NADPH est formé au cours des étapes initiales de la voie des pentoses phosphate et lors de la photosynthèse.

La question fondamentale, à laquelle répond cette troisième partie, est celle de la connaissance du réseau de réactions biochimiques grâce auquel la cellule extrait l'énergie de son environnement. Ce réseau de réactions hautement intégrées est connu sous le nom de métabolisme. Ce dernier se présente comme un ensemble de voies constituées chacune d'une suite de réactions qui s'attaquent à une molécule donnée pour la convertir en une ou plusieurs autres molécules. Toutes les voies métaboliques sont interdépendantes et leurs activités sont coordonnées grâce à l'action d'enzymes allostériques et d'hormones.

Chez les animaux, l'énergie chimique contenue dans l'ATP, directement utilisable par la cellule, résulte de l'oxydation en CO_2 des carbones d'aliments tels que les glucides, les lipides et les aminoacides selon les voies métaboliques de la glycolyse, de la β-oxydation des acides gras et de la désamination oxydative des aminoacides suivie de la dégradation des α-cétoacides résultants. Le cycle de l'acide citrique tient un rôle central ; c'est en effet par son intermédiaire que glucides, lipides et aminoacides apportent à la chaîne respiratoire les électrons de haute énergie sous forme de NADH et de $FADH_2$ et activent donc, dans une phase ultime, l'ATP synthase. Ces voies métaboliques, présentées schématiquement dans la figure ci-contre, sont étudiées dans les chapitres 8 à 12.

De plus, le processus de la photosynthèse qui, en captant l'énergie solaire, est à l'origine de toute l'énergie libre utilisée par les systèmes biologiques, est exposé dans le chapitre 13.



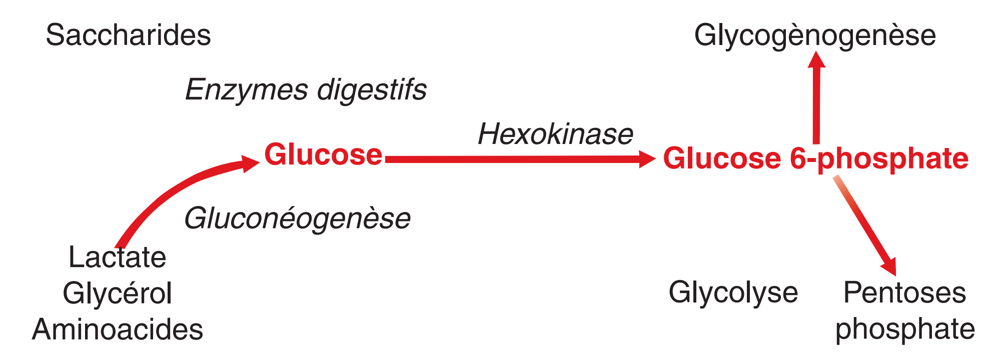
Production d'acétyl-CoA
Oxydation de l'acétyl CoA
Création de précurseurs biosynthétiques
Transfert d'électrons et phosphorylation oxydative
Protéines
Polysaccharides
Lipides
Amino acides
Glucose
Glycérol + Acides gras
Désamination oxydative
Glycolyse
β-Oxydation
4 e⁻
Alanine
Cystéine
Glycine
Sérine
Tryptophane
Pyruvate
Pyruvate déshydrogénase
4 e⁻ par tour
2 e⁻
CO2
Isoleucine
Leucine
Tryptophane
Acétyl CoA
Acétoacétyl CoA
Leucine
Lysine
Phénylalanine
Tryptophane
Tyrosine
Asparagine
Aspartate
Oxaloacétate
Citrate
2 e⁻
Malate
Cycle de l'acide citrique
Isocitrate
CO2
2 e⁻
Aspartate
Phénylalanine
Tyrosine
Fumarate
α-Cétoglutarate
Arginine
Glutamine
Histidine
Proline
CO2
2 e⁻
2 e⁻
Succinate
Succinyl CoA
Isoleucine
Méthionine
Thréonine
Valine
NADH, FADH2
e⁻
Chaîne respiratoire
1/2 O2 + 2H+
H2O
Gradient de protons
ATP synthase
ADP + Pi
ATP

Chapitre 8

Métabolisme du glucose :

glycolyse, voie des pentoses phosphate, glycogénogenèse et glycogénolyse, gluconéogenèse

Dans un très grand nombre de cellules, à côté de leurs rôles structuraux, les glucides ont pour fonction d'y constituer des réserves d'énergie et d'intermédiaires métaboliques. En fait, le glucose est une importante source d'énergie cellulaire et il occupe une position centrale dans le métabolisme. Dans le cytosol des plantes supérieures et des animaux, il a trois destinées majeures ; il peut être oxydé par la glycolyse en pyruvate, source d'ATP et d'intermédiaires du cycle de l'acide citrique ; il peut aussi être oxydé par la voie des pentoses phosphate avec formation de NADPH, pouvoir réducteur nécessaire aux réactions des biosynthèses, et de pentoses, constituants des acides nucléiques ; il peut enfin être mis en réserve sous forme d'amidon ou de glycogène, polysaccharides qui, dans certains états physiologiques, redonnent du glucose directement utilisable.



Chez les animaux, l'apport de glucose vient essentiellement de l'hydrolyse des saccharides de l'alimentation par des enzymes digestifs. Le glucose peut aussi être synthétisé, essentiellement dans le foie, par la voie de la gluconéogenèse (ou néoglucogenèse), à partir de précurseurs non glucidiques tels que le lactate, le glycérol ou certains aminoacides, par l'intermédiaire du pyruvate, de l'oxaloacétate ou du dihydroxyacétone phosphate. Les voies de la glycolyse et de la gluconéogenèse, bien qu'ayant de nombreux enzymes communs, ne sont pas simplement l'inverse l'une de l'autre ; en particulier, les étapes irréversibles de la glycolyse sont contournées dans la gluconéogenèse grâce à un groupe d'enzymes spécifiques. Les deux voies sont étroitement contrôlées et réciproquement régulées afin qu'elles ne puissent pas avoir lieu simultanément dans une même cellule.

ORIGINE ET TRANSPORT DU GLUCOSE

Chez l'Homme, l'amidon et le glycogène constituent la source principale de glucides. L'hydrolyse de ces deux polysaccharides en fragments plus courts, puis en oligosaccharides est tout d'abord effectuée par l'α-amylase salivaire, puis l'α-amylase pancréatique continue le processus de dégradation dans l'intestin ; il en résulte la formation de dextrines et de maltose (p. 66) qui donnent ensuite du glucose après action de la dextrinase et de la maltase, respectivement. Le lactose est hydrolysé en galactose et glucose par la lactase et le saccharose en fructose et glucose par la saccharase. L'intolérance au lactose, fréquente dans la plupart des populations, sauf dans celles de l'Europe du Nord et de certaines régions d'Afrique, est due à la disparition avec l'âge de l'activité lactasique des cellules intestinales. Les micro-organismes du colon fermentent alors le lactose en acide lactique osmotiquement actif, en méthane et en hydrogène, ce qui conduit à des diarrhées et des flatulences.

Les cellules intestinales, mettant à profit le gradient de Na^+ établi par la Na^+K^+ ATPase de leur membrane basolatérale, importent le glucose de la lumière intestinale grâce au symport D-glucose/Na^+ de leur membrane apicale (*Figure 8.1A*) :

$$2Na^+_{ext} + glucose_{ext} \longrightarrow 2Na^+_{int} + glucose_{int}$$

L'énergie requise pour assurer ce processus vient du potentiel chimique dû à la concentration du Na^+ plus grande à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule et du potentiel électrique transmembranaire qui est négatif à l'intérieur de la cellule et attire donc le Na^+ au sein de cette dernière. Le potentiel électrochimique du Na^+ est donné par l'expression :

$$\Delta G = RT\ln \frac{[Na^+]_{int}}{[Na^+]_{ext}} + nF\,\Delta E$$

Le glucose des cellules intestinales passe ensuite dans le sang, puis dans les cellules des divers organes par des mécanismes de transport facilité de type GLUT. Dans les cellules animales, un transport facilité réversible du glucose à travers la membrane plasmique est assuré par des protéines transmembranaires constituées d'une chaîne polypeptidique d'environ 500 résidus aminoacide dont le profil d'hydrophobicité montre la présence de 12 hélices α transmembranaires (*Figure 8.2A*). Ces protéines, dénommées transporteurs du glucose, GLUT1 à GLUT5, ont une spécificité tissulaire. Ainsi, GLUT1 et GLUT3 sont présents dans tous les tissus des mammifères, tandis que GLUT2 est trouvé dans le foie, les cellules β du pancréas et l'intestin grêle et GLUT4 dans le muscle squelettique ou cardiaque et le tissu adipeux. Dans ces deux derniers tissus, un taux élevé de glucose, associé à un taux élevé d'insuline, conduit à une importante pénétration cellulaire du glucose. Un pool préformé de récepteurs GLUT4 est inclus dans des vésicules intracellulaires qui, au contact de l'insuline, fusionnent avec la membrane plasmique et augmentent la capacité cellulaire de transport du glucose.

Figure 8.1

(A)
Lumière intestinale
Glucose
Symport Na+/glucose
2 Na+
Microvillosités
Cellule épithéliale
Na+ K+ ATPase
Sang
2 K+
Glucose
3 Na+
(B)
Asn 45
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
+NH3
COO −

MÉTABOLISME DU GLUCOSE : VUE D'ENSEMBLE

Les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes peuvent synthétiser l'ATP, le NADPH et certains des intermédiaires dont elles ont besoin en métabolisant leur glucose selon la voie de la glycolyse ou celle des pentoses phosphate (*Figure 8.2*). Après avoir pénétré dans la cellule, le glucose est phosphorylé aux dépens de l'ATP en glucose 6-phosphate ; cette étape est fondamentale car le groupe phosphoryle, en raison de ses charges négatives, empêche le glucose de diffuser hors de la cellule et déstabilise la molécule, ce qui facilite les réactions ultérieures.

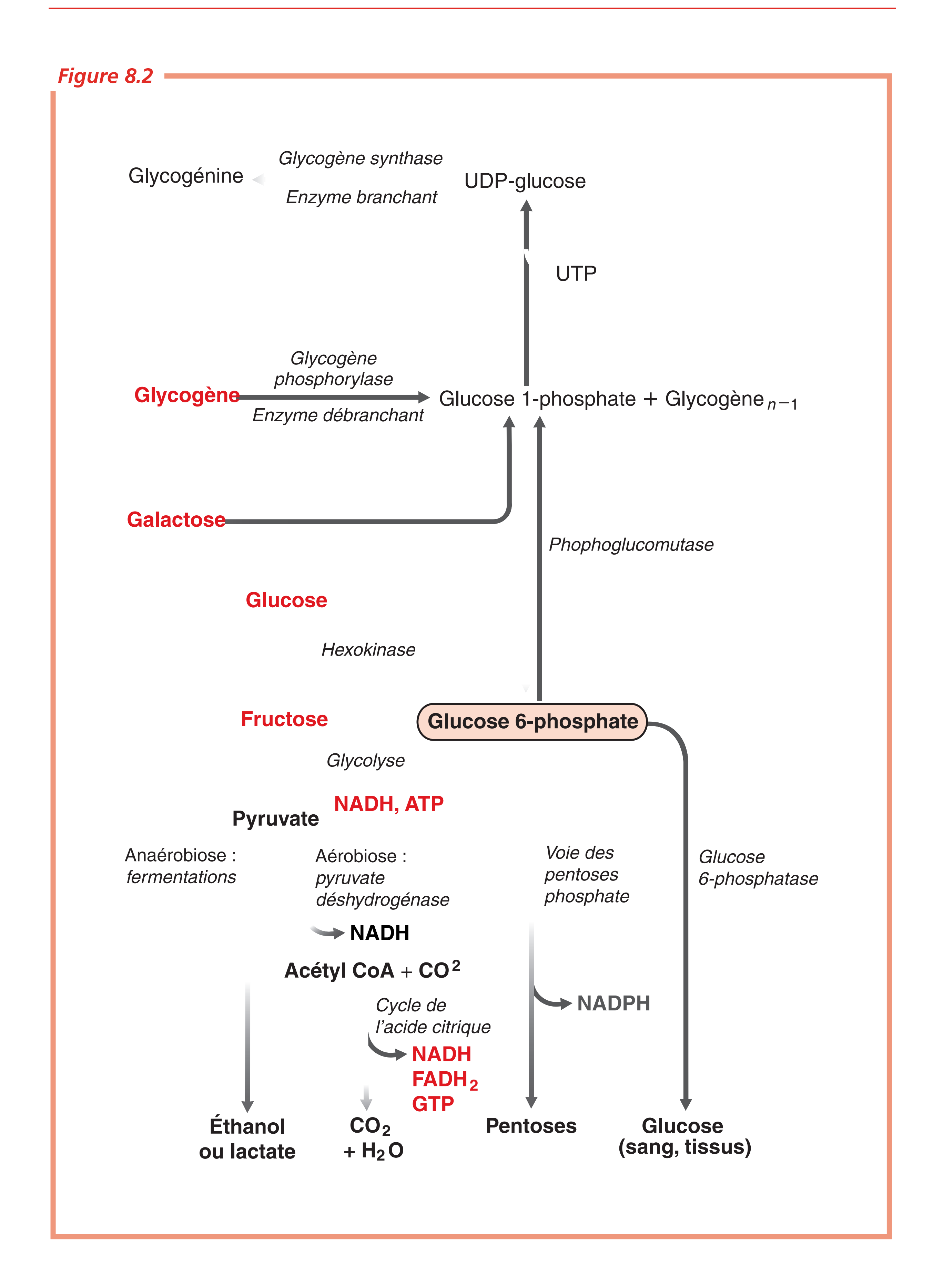
La glycolyse scinde le glucose 6-phosphate en deux molécules de pyruvate avec formation, au total, de deux molécules d'ATP par un mécanisme de phosphorylation au niveau du substrat et de deux molécules de NADH. Le pyruvate, produit ultime de la glycolyse a des destinées diverses selon les conditions physiologiques et les espèces. En anaérobie, il est réduit en éthanol chez les levures ou en lactate chez certains micro-organismes, ainsi que dans les myocytes. En aérobie, chez les Eucaryotes, il est transféré dans les mitochondries où il est métabolisé par le complexe pyruvate déshydrogénase en acétyl CoA qui sera oxydé par le cycle de l'acide citrique ; au cours de ces deux processus métaboliques, il y aura formation de NADH et de $FADH_2$, qui conduiront à la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative, de GTP, ainsi que de certains intermédiaires métaboliques.

Le galactose et le fructose sont quantitativement importants dans l'alimentation puisqu'ils y sont apportés par le lactose du lait et le saccharose d'origine végétale, respectivement. Les animaux n'ont pas de voies cataboliques spécifiques pour oxyder ces deux hexoses qui doivent alors rejoindre la voie de la glycolyse. Le galactose, sous la forme d'UDP-galactose, est épimérisé en UDP-glucose et parvient à la glycolyse par l'intermédiaire du glucose 1-phosphate. Le fructose, après une série de réactions préparatoires, est scindé en dihydroxyacétone phosphate et glycéraldéhyde 3-phosphate qui sont tous deux des intermédiaires glycolytiques.

Dans le foie et, à un moindre degré, dans le rein, le glucose 6-phosphate est hydrolysé par la glucose 6-phosphatase du réticulum endoplasmique en glucose qui sera exporté dans le sang pour y maintenir l'homéostasie.

Enfin, essentiellement dans le foie et le muscle, le glucose 6-phosphate peut être mis en réserve sous forme de glycogène. La concentration du glycogène est plus élevée dans le foie (10 %) que dans le muscle (2 %), mais davantage de glycogène est stocké dans le système musculaire en raison de la plus grande masse de ce dernier. La phosphorolyse contrôlée du glycogène du foie, organe qui possède une glucose 6-phosphatase, permet le maintient du taux du glucose sanguin entre les repas ; celle du glycogène du muscle, organe dépourvu de glucose 6-phosphatase, et qui donc retient son glucose 6-phosphate, apporte l'énergie nécessaire aux pointes d'activité physique.

Figure 8.2


Glycogénine
Glycogène synthase
Enzyme branchant
UDP-glucose
UTP
Glycogène
Glycogène phosphorylase
Enzyme débranchant
Glucose 1-phosphate + Glycogène $_{n-1}$
Galactose
Phophoglucomutase
Glucose
Hexokinase
Fructose
Glucose 6-phosphate
Glycolyse
NADH, ATP
Pyruvate
Anaérobiose : fermentations
Aérobiose : pyruvate déshydrogénase
NADH
Acétyl CoA + CO2
Cycle de l'acide citrique
NADH
$FADH_2$
GTP
Voie des pentoses phosphate
NADPH
Glucose 6-phosphatase
Éthanol ou lactate
CO_2 + H_2O
Pentoses
Glucose (sang, tissus)

GLYCOLYSE

La glycolyse (*Figure 8.3*) s'effectue tout entière dans le protoplasme ou le cytoplasme où elle fait intervenir uniquement des enzymes solubles ; elle ne nécessite pas la présence d'oxygène. La glycolyse évolue jusqu'à la formation de pyruvate en dix réactions qu'on peut répartir en trois étapes fonctionnelles : conversion du glucose en fructose 1,6-bisphosphate, clivage de cet hexose en deux molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate, puis oxydation de ce triose en pyruvate. La glycolyse produit du NADH et de l'ATP par phosphorylation au niveau du substrat lors de la dernière étape. Au total, deux molécules d'ATP sont synthétisées par molécule de glucose métabolisée.

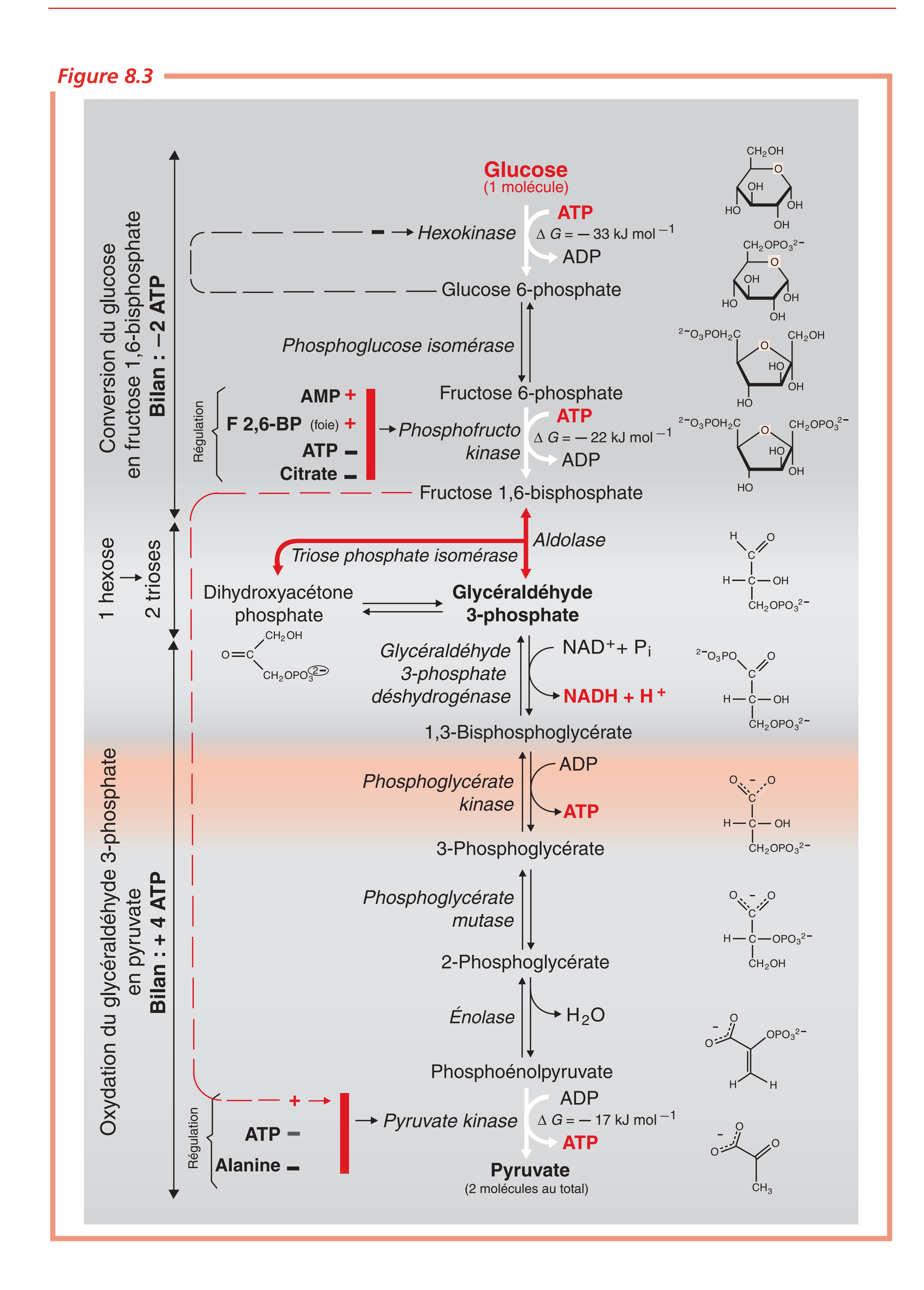
Conversion du glucose en fructose 1,6-bisphosphate

Lors de la première étape de la glycolyse, le glucose est converti en fructose 1,6-bisphosphate (*Figure 8.3*). Cette conversion implique une première phosphorylation, une isomérisation et une seconde phosphorylation. Ces réactions sont catalysées par l'hexokinase, la phosphoglucose isomérase et la phosphofructokinase, respectivement. Rappelons-nous que c'est l'étude du mécanisme catalytique de l'hexokinase qui a conduit à la notion d'adaptation induite (p. 108). Les phosphorylations sont toutes deux réalisées par le transfert du phosphoryle en γ d'un ATP sur un hydroxyle du substrat glucidique qui est alors estérifié. Le mécanisme catalytique est le même pour les deux kinases : un hydroxyle du substrat effectue l'attaque nucléophile du phosphore γ du $MgATP^{2-}$, au niveau du site enzymatique de fixation de ce coenzyme nucléotidique (p. 128). Le mécanisme de l'isomérisation du glucose 6-phosphate en fructose 6-phosphate, comme celui de la plupart des isomérisations aldose-cétose, fait intervenir un ènediol intermédiaire lié à l'enzyme, comme il sera montré prochainement dans le cas de la triose phosphate isomérase.

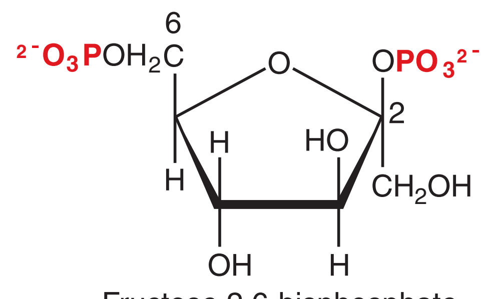
La première réaction de la glycolyse, qui conduit au glucose 6-phosphate, est catalysée par l'hexokinase. Elle est métaboliquement irréversible. C'est un site de régulation de la glycolyse. En effet, le glucose 6-phosphate, à concentration élevée, inhibe allostériquement les isozymes I, II et III de l'hexokinase présents dans la plupart des organes. En revanche, il n'inhibe pas l'isozyme IV, appelé encore glucokinase, qui prédomine dans le foie et le pancréas. Ainsi, l'activité glucokinasique du foie permet de répondre efficacement à de fortes concentrations hépatiques de glucose afin que ce dernier puisse être orienté vers la glycolyse, ou vers la voie des pentoses phosphate, ou encore vers la glycogénogenèse (p. 162).

La troisième réaction de la glycolyse, qui conduit au fructose 1,6-bisphosphate, est contrôlée par un enzyme allostérique, la phosphofructokinase 1 (PFK1). Elle est, elle aussi, métaboliquement irréversible. Cette réaction, qui engage le glucose dans la voie de la glycolyse, est un important site de régulation de cette dernière.

Figure 8.3


Conversion du glucose en fructose 1,6-bisphosphate
Bilan : –2 ATP
1 hexose → 2 trioses
Oxydation du glycéraldéhyde 3-phosphate en pyruvate
Bilan : + 4 ATP
Glucose
(1 molécule)
ATP
Hexokinase
Δ G = – 33 kJ mol –1
ADP
Glucose 6-phosphate
Phosphoglucose isomérase
Fructose 6-phosphate
Régulation
AMP +
F 2,6-BP (foie) +
ATP –
Citrate –
ATP
Phosphofructo kinase
Δ G = – 22 kJ mol –1
ADP
Fructose 1,6-bisphosphate
Aldolase
Triose phosphate isomérase
Dihydroxyacétone phosphate
Glycéraldéhyde 3-phosphate
Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
NAD+ + Pi
NADH + H+
1,3-Bisphosphoglycérate
Phosphoglycérate kinase
ADP
ATP
3-Phosphoglycérate
Phosphoglycérate mutase
2-Phosphoglycérate
Énolase
H2O
Phosphoénolpyruvate
Régulation
ATP –
Alanine –
Pyruvate kinase
ADP
Δ G = – 17 kJ mol –1
ATP
Pyruvate
(2 molécules au total)

Les PFK1 des mammifères sont des tétramères constitués de sous-unités allongées où le site actif catalytique est éloigné du site allostérique régulateur (*Figure 8.4*). L'activité de la PFK1 est dépendante des besoins de la cellule en énergie et en intermédiaires métaboliques ; elle est inhibée lorsque la concentration de l'ATP est élevée (*Figure 8.5A*) ; de plus, l'AMP diminue et le citrate augmente l'effet inhibiteur de l'ATP. L'activité de la PFK1 est régulée par un activateur allostérique, le fructose 2,6-bisphosphate, (F 2,6-BP), qui déplace l'équilibre conformationnel de l'enzyme tétramérique de l'état *T* vers l'état *R* (*Figure 8.5B*). Le fructose 2,6-bisphosphate résulte de la phosphorylation du fructose 6-phosphate par la phosphofructokinase 2 (PFK2) ; il est hydrolysé par la fructose bisphosphatase 2 (FBPase2). Ces deux enzymes sont inclus dans une chaîne polypeptidique de 55 kDa qui représente donc un enzyme bifonctionnel ; en outre, cette chaîne possède un domaine régulateur N-terminal (*Figure 8.5C*). Le fructose 6-phosphate accélère la synthèse du fructose 2,6-bisphosphate et inhibe son hydrolyse. Ainsi donc, une concentration élevée de fructose 6-phosphate conduit à une forte concentration de fructose 2,6-bisphosphate qui lui-même stimule la PFK1 (*Figure 8.5D*). De plus, l'activité de l'enzyme bifonctionnel est régulée par une modification covalente : la phosphorylation d'un résidu sérine inhibe la PFK2 et active la FBPase2.



Fructose 2,6-bisphosphate

Figure 8.4

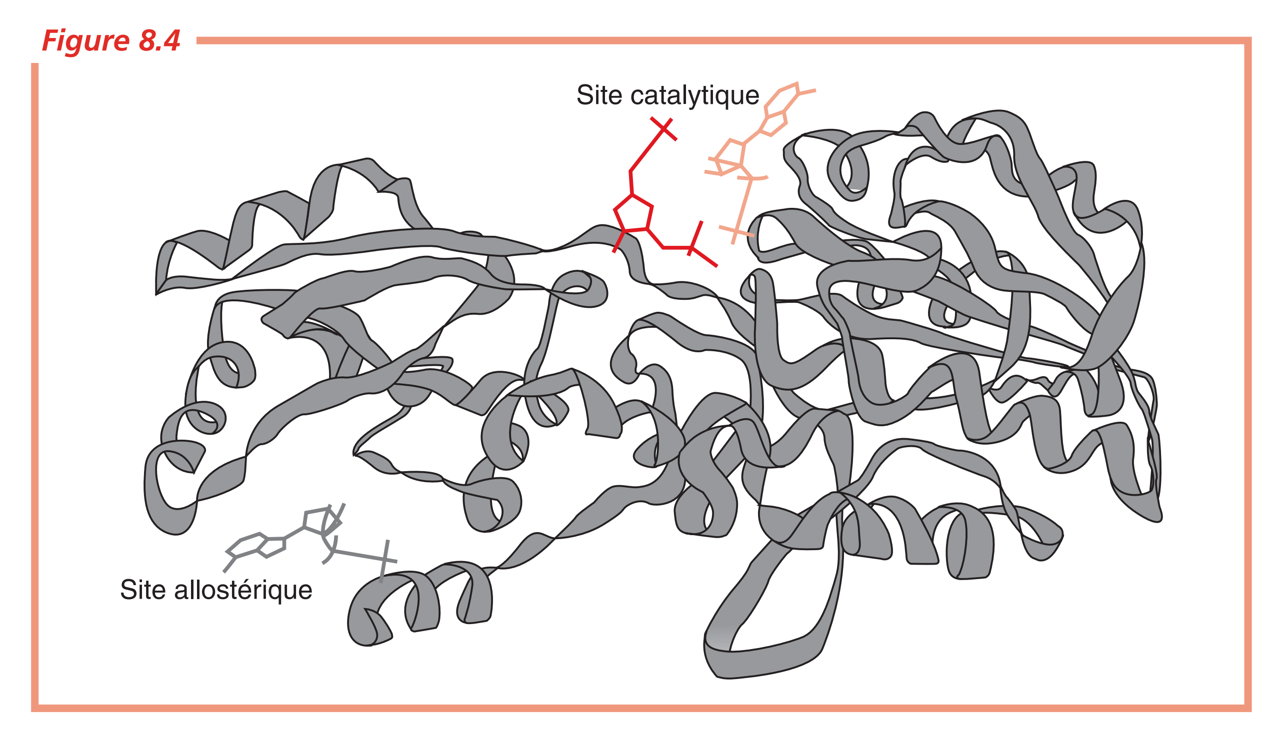
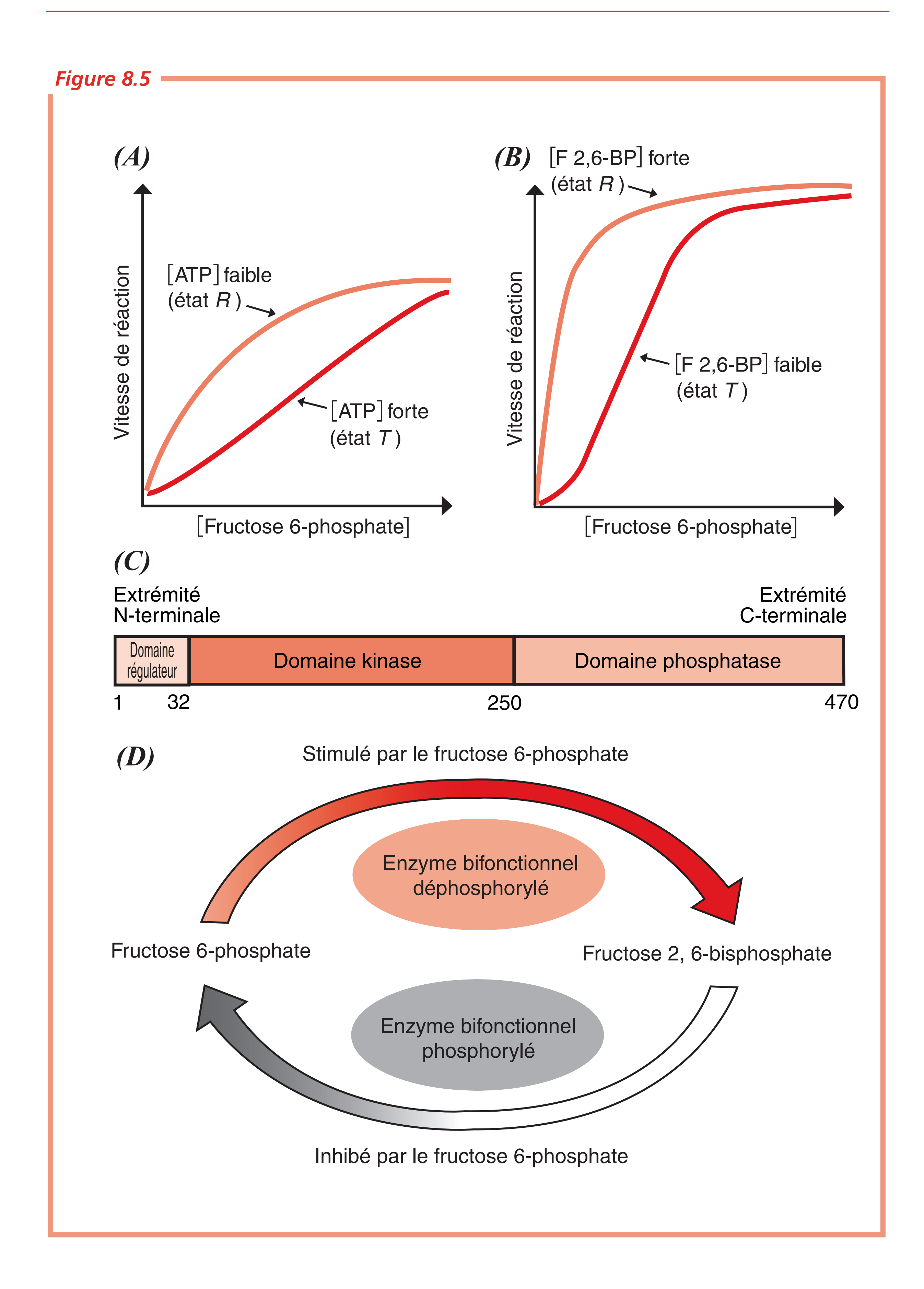


Figure 8.5


(A)
Vitesse de réaction
[ATP] faible
(état R)
[ATP] forte
(état T)
[Fructose 6-phosphate]
(B)
[F 2,6-BP] forte
(état R)
Vitesse de réaction
[F 2,6-BP] faible
(état T)
[Fructose 6-phosphate]
(C)
Extrémité
N-terminale
Extrémité
C-terminale
Domaine
régulateur
Domaine kinase
Domaine phosphatase
1
32
250
470
(D)
Stimulé par le fructose 6-phosphate
Enzyme bifonctionnel
déphosphorylé
Fructose 6-phosphate
Fructose 2, 6-bisphosphate
Enzyme bifonctionnel
phosphorylé
Inhibé par le fructose 6-phosphate

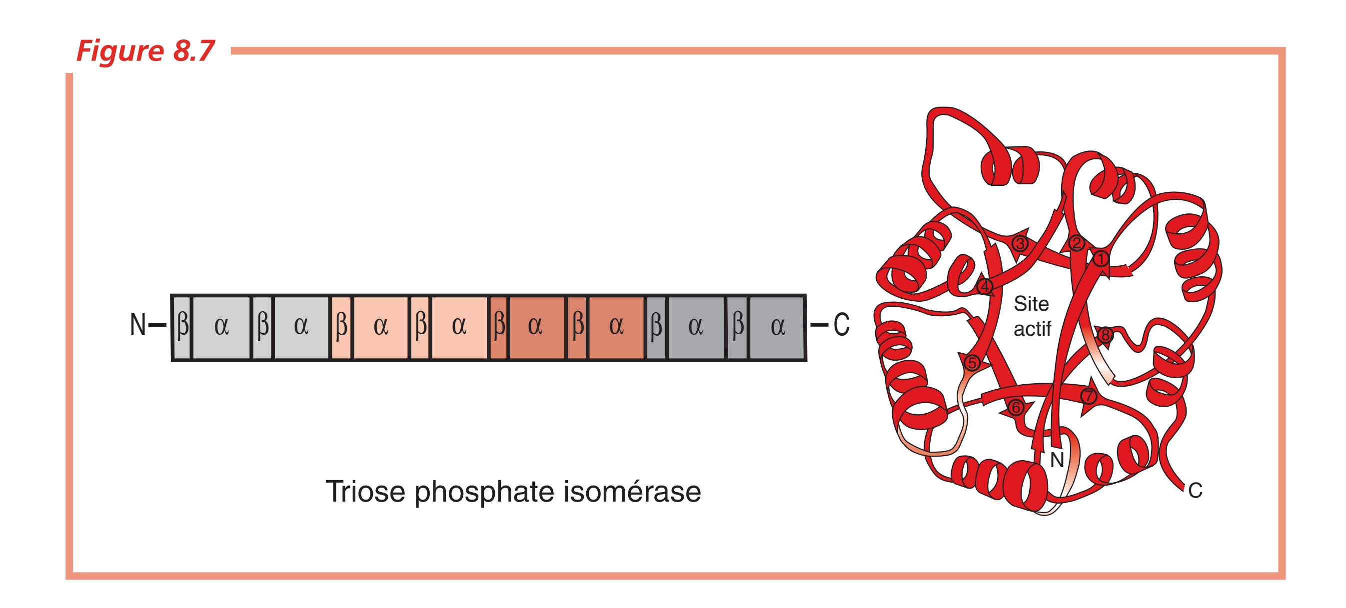
Formation du glycéraldéhyde 3-phosphate

Lors de la deuxième étape de la glycolyse, le fructose 1,6-bisphosphate donne deux molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate (*Figure 8.3*). Lors d'une première réaction, le fructose 1,6-bisphosphate est scindé en une molécule de glycéraldéhyde 3-phosphate et une molécule de dihydroxyacétone phosphate. Ce dernier est rapidement isomérisé en une deuxième molécule de glycéraldéhyde 3-phosphate. La formation du glycéraldéhyde 3-phosphate fait intervenir une fructose 1,6-bisphosphate aldolase et une triose phosphate isomérase.

L'aldolase de la plupart des Vertébrés est une protéine tétramérique. Elle catalyse le clivage de la liaison C-3–C-4 du fructose 1,6-bisphosphate grâce à un mécanisme dit clivage aldolique (contraction d'aldéhyde et d'alcool), car il coupe la liaison unissant un carbone porteur d'un carbonyle, aldéhydique ou cétonique, et un carbone porteur d'un hydroxyle alcoolique (*Figure 8.6*). Ce clivage est à l'origine du terme glycolyse qui a donné son nom à cette voie de dégradation du glucose. Un résidu lysine du site actif de l'enzyme réagit avec le carbonyle en C-2 du substrat pour former une base de Schiff intermédiaire. De plus, un autre résidu basique B^- de l'enzyme accepte un proton de l'hydroxyle en C-4 du substrat.

La triose phosphate isomérase est construite à partir de quatre motifs β–α–β–α qui sont consécutifs dans la séquence des aminoacides et dans la structure tridimensionnelle ; ensemble, ils réalisent une structure en tonneau αβ (*Figure 8.7*). Le site actif se situe à l'extrémité supérieure du tonneau et peut fixer le glycéraldéhyde 3-phosphate ou le dihydroxyacétone phosphate. Le site actif de la triose phosphate isomérase contient le résidu glutamate 165, chargé négativement au pH physiologique, qui joue un rôle catalytique essentiel en se comportant comme une base générale. Ce résidu agit de concert avec le résidu histidine 95 pour réaliser une navette à protons entre certains atomes du substrat (*Figure 8.8*). La triose phosphate isomérase accélère la réaction d'un facteur 10^{10} et le rapport k_{cat}/K_M, qui se situe entre 2 et $4 \cdot 10^8$ M^{-1} s^{-1}, est proche de la limite contrôlée par la diffusion. C'est l'un des enzymes les plus rapides du métabolisme ; il a atteint la perfection cinétique (p. 99).

Figure 8.7



Triose phosphate isomérase

Figure 8.6

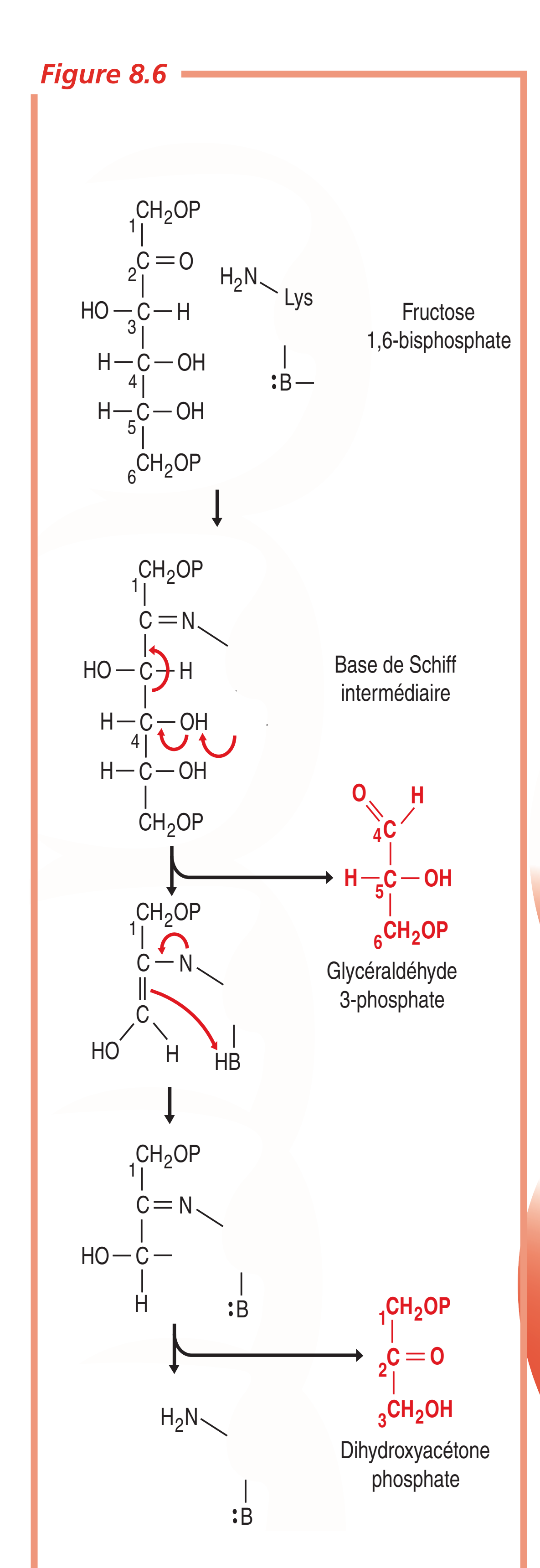


Figure 8.8

His 95
CH_2
Glu 165
H_2C
Dihydroxyacétone phosphate
H
OH
C=O
CH_2OP
Énediol intermédiaire
C—OH
Glycéraldéhyde 3-phosphate
H—C—OH
$O^{\ominus}$

Oxydation du glycéraldéhyde 3-phosphate et première phosphorylation

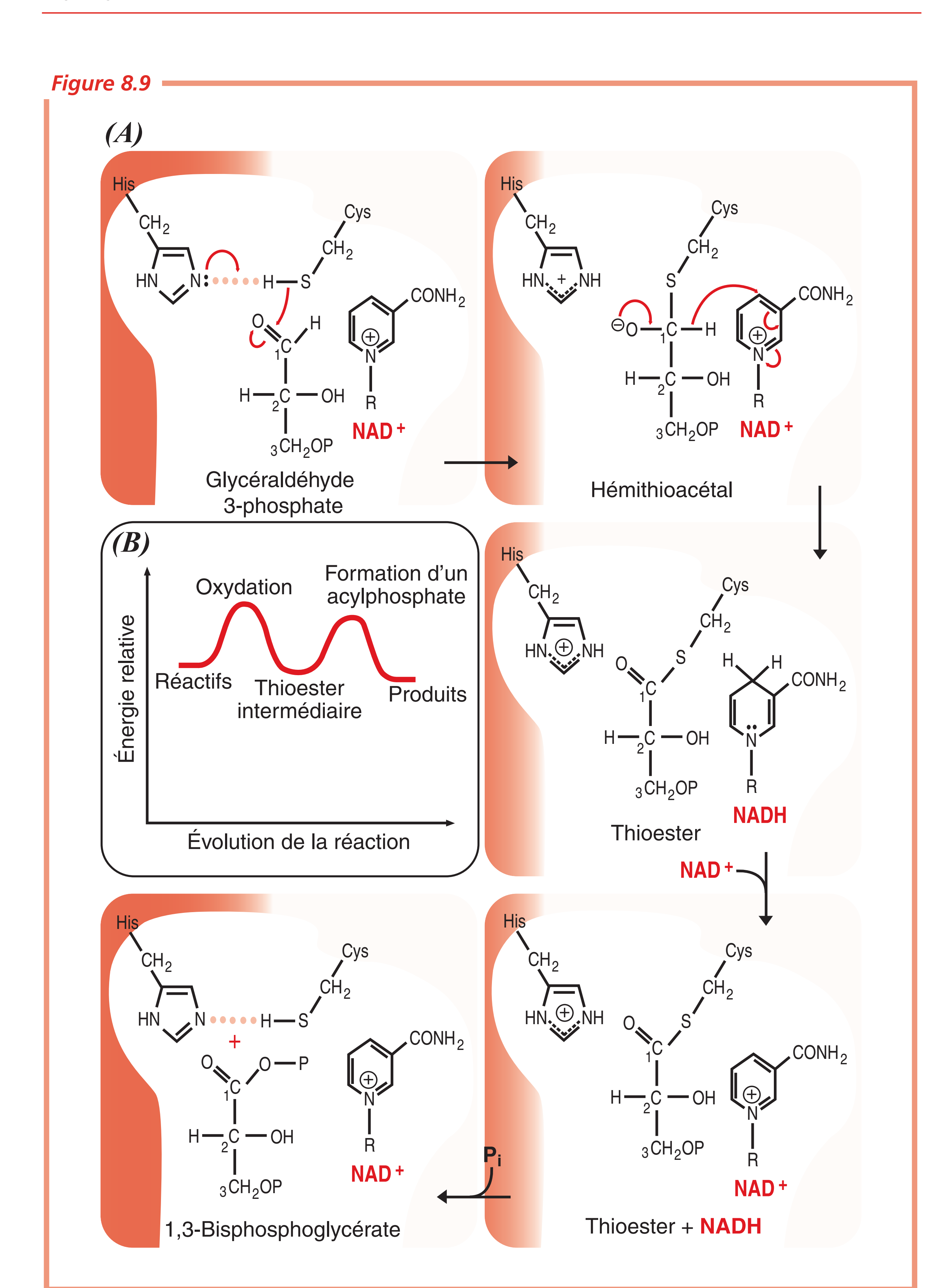
Lors d'une première phase de la troisième étape de la glycolyse, le glycéraldéhyde 3-phosphate est oxydé en 1,3-bisphosphoglycérate dont le phosphoryle lié au C-1 est ensuite transféré sur l'ADP avec formation de 3-phosphoglycérate et d'une première molécule d'ATP (*Figure 8.3*).

Dans une première réaction, la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase catalyse la phosphorylation oxydative de son substrat aldéhydique (*Figure 8.9A*). Le groupe aldéhyde -CHO du glycéraldéhyde 3-phosphate est oxydé par le NAD^+. Cette oxydation, la seule de la glycolyse anaérobie, est couplée à l'addition d'un groupe phosphate. Il en résulte la formation du 1,3-bisphosphoglycérate, dont le phosphoryle de la liaison acylphosphate possède un haut pouvoir de transfert. L'oxydation consiste en l'élimination d'un ion hydrure H^- facilitée par le groupe sulfhydryle nucléophile d'un résidu cystéine du site actif de l'enzyme. Le substrat réagit avec la forme ionisée de cette cystéine pour former un hémithioacétal. Un ion hydrure est transféré à un NAD^+ intimement lié à l'enzyme (p. 126) ; le NAD^+ est réduit en NADH et un thioester est formé ; le NADH se dissocie puis est remplacé par un autre NAD^+. Le thioester est ensuite attaqué par l'orthophosphate pour donner le 1,3-bisphosphoglycérate dont le phosphoryle de la liaison acylphosphate possède un haut pouvoir de transfert. Le mécanisme de réaction de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase donne un exemple de l'utilisation d'un intermédiaire covalent lié à l'enzyme, en l'occurrence un thioester de haut potentiel de transfert, comme mécanisme de couplage énergétique (*Figure 8.9.B*). En effet, une réaction endergonique, la formation d'un acylphosphate à partir d'un carboxylate est rendue thermodynamiquement possible par son couplage à une réaction exergonique, l'oxydation d'un aldéhyde. Au cours de cette première réaction de la troisième étape de la glycolyse, il est donc réalisé la synthèse d'un premier composé possédant un phosphoryle de haut potentiel de transfert.

Dans une seconde réaction, la phosphoglycérate kinase catalyse le transfert du phosphoryle de haut potentiel du 1,3-bisphosphoglycérate sur l'ADP, ce qui conduit à la formation du 3-phosphoglycérate et à la création d'une première molécule d'ATP. La formation d'un ATP par transfert d'un phosphoryle de haut potentiel de transfert appartenant à un intermédiaire métabolique est dénommée phosphorylation au niveau du substrat. Cette réaction est la première à créer un ATP lors de la glycolyse. Au sein de la cellule, elle est à l'équilibre et, par conséquent, n'est pas un site de régulation, contrairement aux trois autres phosphorylations de la voie.

Ainsi, au cours des réactions catalysées par la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase et la phosphoglycérate kinase, un aldéhyde, le glycéraldéhyde 3-phosphate, est oxydé en un acide carboxylique, le 3-phosphoglycérate ; un NAD^+ est réduit en NADH ; un ATP est formé grâce à l'énergie d'oxydation du carbone. Étant donné que deux molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate sont formées à partir d'une molécule de glucose, deux molécules de NADH et deux molécules d'ATP sont créées à ce stade de la glycolyse.

Figure 8.9


(A)
His
CH2
HN
N
H
S
CH2
Cys
O
C
1
H
CONH2
N
R
NAD+
H
C
2
OH
3CH2OP
Glycéraldéhyde
3-phosphate
Hémithioacétal
Thioester
NADH
NAD+
Thioester + NADH
Pi
1,3-Bisphosphoglycérate
(B)
Énergie relative
Oxydation
Formation d'un
acylphosphate
Réactifs
Thioester
intermédiaire
Produits
Évolution de la réaction

Formation du pyruvate et deuxième phosphorylation

Lors d'une deuxième phase de la troisième étape de la glycolyse, le 3-phosphoglycérate est converti en pyruvate avec formation d'une deuxième molécule d'ATP (*Figure 8.3*). L'activation du 3-phosphoglycérate commence par son isomérisation en 2-phosphoglycérate, catalysée par la phosphoglycéromutase ; il s'agit d'un réarrangement qui déplace le phosphoryle de la position 2 à la position 3. Le mécanisme catalytique de l'enzyme fait intervenir un composé intermédiaire, le 2,3-bisphosphoglycérate, et requiert la présence de Mg^{2+} (*Figure 8.10*)

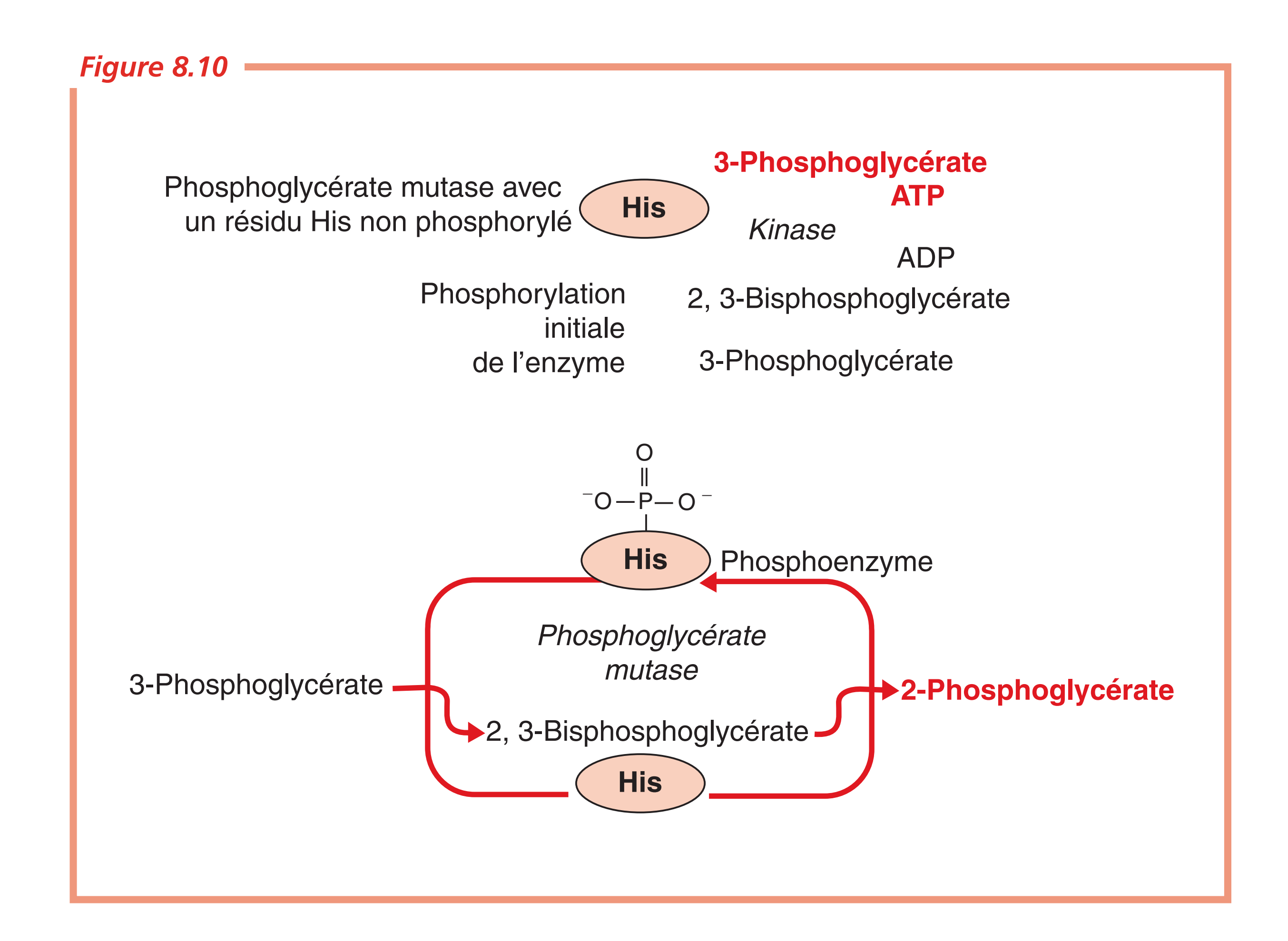
Dans la réaction suivante, catalysée par l'énolase, la déshydratation du 2-phosphoglycérate conduit à la formation du phosphoénolpyruvate. Cette αβ-élimination augmente considérablement le potentiel de transfert du phosphoryle. En effet, la variation d'énergie libre de la réaction globale est minime, + 1,7 kJ mol^{-1}, mais l'énergie libre d'hydrolyse de la liaison phosphate est considérablement augmentée : son $\Delta G°'$ passe de – 15,6 kJ mol^{-1} pour le 2-phosphoglycérate à – 62 kJ mol^{-1} pour le phosphoénolpyruvate. Le potentiel de transfert du phosphoryle du phosphoénolpyruvate est très élevé parce que l'énol qui sera formé après le transfert est très instable et évoluera vers la forme cétonique. Au cours de cette deuxième phase de la troisième étape de la glycolyse, il est donc réalisé la synthèse d'un deuxième composé possédant un phosphoryle de haut potentiel de transfert.

Dans une dernière réaction, catalysée par la pyruvate kinase, le phosphoryle du phosphoénolpyruvate peut alors être transféré sur l'ADP pour créer de l'ATP lors d'une seconde phosphorylation au niveau du substrat, tandis qu'apparaît le pyruvate. Cette réaction est métaboliquement irréversible ; c'est le troisième site de régulation par phosphorylation de la glycolyse. La pyruvate kinase du foie des Vertébrés, qui requière K^+ et Mg^{2+} ou Mn^{2+} pour être active, est un tétramère d'environ 250 kDa ; elle est allostériquement activée par le fructose 1,6-bisphosphate et inhibée par l'ATP. L'activité de la pyruvate kinase est aussi modulée par modification covalente : elle est diminuée par phosphorylation par la protéine kinase A cAMP-dépendante.

BILAN DE LA GLYCOLYSE

La dernière étape de la glycolyse montre comment sont couplées des interconversions de métabolites solubles par des enzymes cytosoliques afin de créer du NADH, de l'ATP et du pyruvate. Chez les Eucaryotes, 2 molécules de NADH et, au total, uniquement 2 molécules d'ATP sont formées lors de la conversion d'une molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate.

La glycolyse est étroitement coordonnée aux autres voies qui créent l'essentiel de l'énergie et les intermédiaires métaboliques venant des glucides, en particulier à celles des pentoses phosphate, de la glycogénogenèse, de la glycogénolyse, de la gluconéogenèse et du cycle de l'acide citrique ; en effet, les facteurs qui contrôlent la glycolyse interviennent aussi dans ces dernières. Il est à considérer cependant que ce sont essentiellement les activités de la phosphofructokinase et de la pyruvate kinase qui régulent le flux des intermédiaires entre le glucose 6-phosphate et le pyruvate.



Outre la production de NADH, d'ATP et de pyruvate, la glycolyse permet aussi la synthèse du 2,3-bisphosphoglycérate dans les globules rouges où il intervient comme inhibiteur allostérique de l'oxygénation de l'hémoglobine (p. 406). Les érythrocytes contiennent une bisphosphoglycérate mutase qui catalyse le transfert du phosphoryle du C-1 sur le C-2 du 1,3-bisphosphoglycérate. L'activité de la bisphosphoglycérate mutase est régulée par le 2,3-bisphosphoglycérate lui-même, une accumulation de ce métabolite inhibant l'enzyme.

CANCER ET GLYCOLYSE

Les tumeurs cancéreuses présentent une glycolyse environ dix fois plus active que celle des tissus sains car elles se développent plus vite que les vaisseaux qui les irriguent et sont souvent en hypoxie. La glycolyse anaérobie conduisant à une fermentation lactique est alors la source essentielle d'ATP pour les cellules cancéreuses qui, de plus, ont moins de mitochondries que les cellules normales. Enfin, l'hypoxie induit le facteur de transcription HIF-1 (de *hypoxia-inducible factor*) qui augmente l'expression de la plupart des enzymes glycolytiques et des transporteurs GLUT1 et GLUT3.

MÉTABOLISME DU GALACTOSE ET DU FRUCTOSE

Le galactose résultant de l'hydrolyse du lactose et le fructose venant de celle du saccharose, mais aussi présent en quantité importante dans le miel (environ 38 % en poids), sont, après le glucose, les deux hexoses quantitativement les plus abondants dans l'alimentation des mammifères ; cependant, ces derniers n'ont pas de voies permettant d'oxyder spécifiquement le galactose ou le fructose qui doivent donc rejoindre la voie de la glycolyse.

Lactose **Saccharose**

Le galactose (*Figure 8.11A*) est tout d'abord phosphorylé par la galactokinase en galactose 1-phosphate qui, lors d'une réaction catalysée par la galactose 1-phosphate uridyltransférase, acquière un groupe uridyle de l'UDP-glucose ; de cette réaction clé, il résulte également la formation de glucose 1-phosphate qui est isomérisé en glucose 6-phosphate susceptible d'être métabolisé selon la voie glycolytique. L'UDP-galactose peut être épimérisé en UDP-glucose qui est alors régénéré. L'UDP-glucose n'est pas consommé dans la conversion du galactose en glucose car il est régénéré de l'UDP-galactose par la galactose 1-phosphate uridyltransférase. De plus, cette réaction est réversible et l'UDP-glucose peut être converti en UDP-galactose nécessaire à la synthèse des résidus galactosyl des glycoconjugués lorsque l'apport alimentaire en est insuffisant.

Le galactose est extrêmement toxique et doit impérativement être métabolisé, comme en témoigne la gravité de la galactosémie congénitale, maladie due à un déficit héréditaire en galactose 1-phosphate uridyltransférase. Les enfants qui en sont atteints, outre des vomissements, des diarrhées et un ictère, présentent un important retard de développement, des dysfonctionnements du système nerveux central, une hépatomégalie évoluant vers une cirrhose et une cataracte. Les femmes ont souvent un déficit ovarien. Le seul traitement actuellement possible est l'élimination du galactose et du lactose de l'alimentation, mais les séquelles demeurent graves et le pronostic est réservé. En effet, si les altérations hépatiques et la cataracte peuvent être évitées par l'exclusion précoce du lactose dans le régime, l'atteinte du système nerveux central est souvent mal contrôlée et l'acquisition du langage retardée.

Le fructose (*Figure 8.11B*) est métabolisé dans le foie selon la voie du fructose 1-phosphate formé par la fructokinase. Ce dernier est scindé par la fructose 1-phosphate aldolase en glycéraldéhyde et dihydroxyacétone phosphate, qui est un intermédiaire de la glycolyse. Le glycéraldéhyde, après avoir été phosphorylé en glycéraldéhyde 3-phosphate, rejoint lui aussi la voie glycolytique.

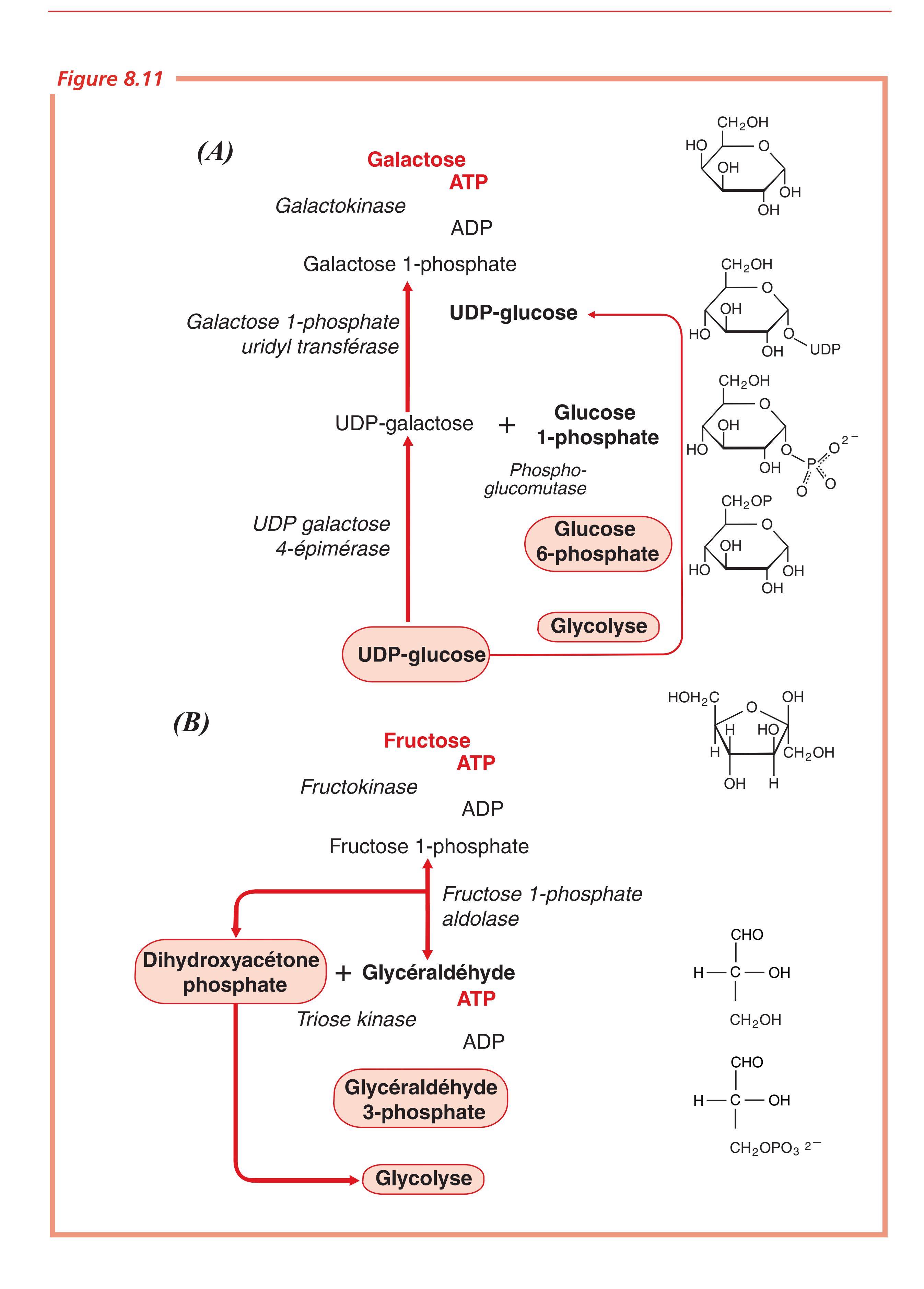


Figure 8.11
(A)
Galactose
ATP
Galactokinase
ADP
Galactose 1-phosphate
Galactose 1-phosphate uridyl transférase
UDP-glucose
UDP-galactose
+
Glucose 1-phosphate
Phospho-glucomutase
UDP galactose 4-épimérase
Glucose 6-phosphate
Glycolyse
UDP-glucose
CH_2OH
HO
O
OH
OH
OH
UDP
O^{2-}
P
O
CH_2OP
(B)
Fructose
ATP
Fructokinase
ADP
Fructose 1-phosphate
Fructose 1-phosphate aldolase
Dihydroxyacétone phosphate
+ Glycéraldéhyde
ATP
Triose kinase
ADP
Glycéraldéhyde 3-phosphate
Glycolyse
HOH_2C
H
HO
CH_2OH
CHO
H — C — OH
CH_2OH
$CH_2OPO_3^{2-}$

VOIE DES PENTOSES PHOSPHATE ET CRÉATION DE NADPH ET DE PENTOSES

Dans les paragraphes précédents de ce chapitre, nous avons vu comment Procaryotes et Eucaryotes créent de l'énergie sous forme d'ATP, par phosphorylation au niveau du substrat, ainsi que certains intermédiaires métaboliques, lors de la glycolyse. Nous allons maintenant voir comment ils créent du pouvoir réducteur sous forme de NADPH, des pentoses et d'autres intermédiaires métaboliques lors d'une autre voie essentielle, celle des pentoses phosphate (*Figure 8.12*) qui procède en deux phases, une phase oxydative et une phase non oxydative.

Lors des réactions de la phase oxydative de la voie des pentoses phosphate, le glucose 6-phosphate est tout d'abord déshydrogéné en C-1 par la glucose 6-phosphate déshydrogénase. La spécificité de cette dernière pour le $NADP^+$ étant stricte, il en résulte la réduction stœchiométrique d'une première molécule de $NADP^+$ en NADPH et la formation de 6-phosphogluconolactone. Cette réaction, essentiellement irréversible *in vivo*, est un site de contrôle de la voie qui est donc régulée par le taux de $NADP^+$. La 6-phosphogluconolactone est rapidement hydrolysée en 6-phosphogluconate par une lactonase spécifique. Le 6-phosphogluconate est l'objet d'une décarboxylation oxydative par la 6-phosphogluconate déshydrogénase, elle aussi très spécifique pour le $NADP^+$. Cette réaction de la phase oxydative des pentoses phosphate permet la réduction d'une deuxième molécule de $NADP^+$ en NADPH et conduit à la formation du ribulose 5-phosphate. Ce dernier pourra être isomérisé en ribose 5-phosphate par la phosphopentose isomérase ou épimérisé en xylulose 5-phosphate par la phosphopentose épimérase.

Cependant, de nombreuses cellules ont besoin de plus de NADPH pour leurs synthèses réductrices que de ribose 5-phosphate à incorporer dans leurs nucléotides ou leurs acides nucléiques. Le ribulose 5-phosphate pourra alors être le premier substrat des réactions de la phase dite non oxydative de la voie des pentoses phosphate ; ces réactions, catalysées par la transcétolase et la transaldolase, permettront l'interconversion d'oses à trois, quatre, cinq, six ou sept carbones. Parmi ces derniers, le glycéraldéhyde 3-phosphate et le fructose 6-phosphate créent un lien réversible entre la voie des pentoses phosphate et la glycolyse.

Xylulose 5-phosphate	Ribose 5-phosphate	Glycéraldéhyde 3-phosphate	Sédoheptulose 7-phosphate	Fructose 6-phosphate	Érythrose 4-phosphate


Figure 8.12

Phase 1 (oxydative)
Phase 2 (non oxydative)
Glucose 6-phosphate
Glucose 6-phosphate déshydrogénase
NADP+
NADPH + H+
6-Phosphogluconolactone
Gluconolactone
H2O
H+
6-Phosphogluconate
6-Phosphogluconate déshydrogénase
NADP+
NADPH + H+
CO2
Ribulose 5-phosphate
Phosphopentose isomérase
Phosphopentose épimérase
Ribose 5-phosphate
Xylulose 5-phosphate
Transcétolase
Glycéraldéhyde 3-phosphate
Sédoheptulose 7-phosphate
Transaldolase
Fructose 6-phosphate
Érythrose 4-phosphate
Xylulose 5-phosphate
Transcétolase
Fructose 6-phosphate
Glycéraldéhyde 3-phosphate
CH2OPO3 2−
O
OH
HO
OH
OH
Glucose 6-phosphate
CH2OPO3 2−
H
O
H
C=O
OH
H
HO
OH
6-Phosphogluconolactone
−O
O
C
H—C—OH
HO—C—H
H—C—HO
H—C—HO
CH2OPO3 2−
6-Phosphogluconate
CH2OH
C=O
H—C—OH
H—C—OH
CH2OPO3 2−
Ribulose 5-phosphate

GLYCOGÉNOGENÈSE

Le glucose, sous sa forme activée uridine diphosphate, l'UDP-glucose, est ajouté par la glycogène synthase, enzyme clé de la glycogénogenèse, à l'extrémité non réductrice d'une molécule de glycogène grâce à la formation d'une liaison glucosidique α-1,4 (*Figure 8.13A*). L'UDP-glucose est synthétisé à partir du glucose 1-phosphate et de l'uridine triphosphate (UTP) au cours d'une réaction catalysée par l'UDP-glucose pyrophosphorylase ; dans la cellule, la réaction s'effectue dans le sens de la synthèse de l'UDP-glucose en raison de l'hydrolyse du pyrophosphate en deux molécules de P_i par une pyrophosphatase inorganique ($\Delta G°' = -25$ kJ mol^{-1}).

Après qu'un certain nombre de résidus glucosyle aient été fixés, un autre enzyme, la glycosyl-(4,6)-transférase ou enzyme branchant, transfère, à partir d'une branche contenant au moins 11 résidus, un bloc de 7 résidus incluant l'extrémité non réductrice sur le groupe hydroxyle en C-6 d'un résidu glucosyle situé au niveau d'une position antérieure sur la même chaîne ou sur une autre chaîne de la molécule de glycogène (*Figure 8.13B*). Cette réaction de branchement est physiologiquement importante car elle augmente la solubilité du glycogène ainsi que le nombre de résidus terminaux qui seront des sites d'actions de la glycogène synthase ou, lors de la glycogénolyse, de la glycogène phosphorylase.

La glycogénogenèse ne peut s'effectuer qu'à partir d'une amorce, en l'occurrence une protéine, la glycogénine, constituée de deux sous-unités identiques de 37 kDa portant chacune une chaîne polysaccharidique de 8 résidus formée autocatalytiquement (*Figure 8.14*). À partir de ce stade, la synthase et l'enzyme branchant prennent le relais et synthétisent la molécule de glycogène.

Régulation de la glycogénogenèse

L'activité de la glycogène synthase est régulée par modification covalente. L'enzyme se présente sous la forme *a*, non phosphorylée, pleinement active, ou la forme *b*, phosphorylée sur des résidus sérine et très négativement chargée, beaucoup moins active. Le passage d'une forme à une autre est réalisé par des protéine kinases ou des phosphoprotéine phosphatases en réponse à des stimulations hormonales : l'activité de la synthase est augmentée par l'insuline dans le foie et le muscle, elle est diminuée par le glucagon dans le foie et par l'adrénaline dans le muscle.

Figure 8.14

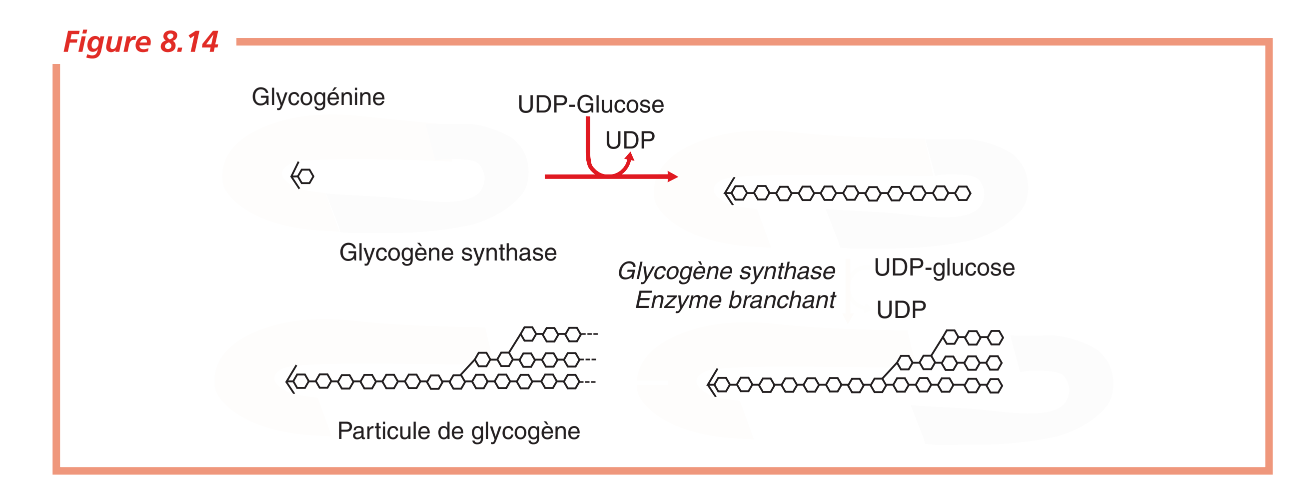


Figure 8.13

(A)

CH_2OH OH HO OH O $^{2-}$ O P O O

Glucose 1-phosphate

+ $^{2-}$ O P O O O – O P O – O P O Uridine

UTP

UDP-glucose pyrophosphorylase

PP_i *Pyrophosphatase* **2 P_i**

CH_2OH OH HO OH O P O P O Uridine

UDP-glucose

+

CH_2OH OH HO OH O CH_2OH OH OH OR

Extrémité non réductrice

Glycogène (*n* résidus)

Glycogène synthase

UDP

CH_2OH OH HO OH O CH_2OH OH OH O CH_2OH OH OH OR

Extrémité non réductrice

Glycogène (*n* + 1 résidu)

(B)

Enzyme branchant

HO 1 4 5

Extrémité non réductrice

CH_2OH

Glycogène

HO 1 5

Extrémité non réductrice

O ← (α1→6)

HO

Extrémité non réductrice

Glycogène

GLYCOGÉNOLYSE

La glycogénolyse s'effectue en trois étapes (*Figure 8.15A*) : une phosphorolyse des liaisons α-1,4 de la molécule de glycogène, catalysée par la glycogène phosphorylase, enzyme clé de la dégradation du glycogène, avec libération de glucose 1-phosphate ; un remodelage de la molécule de glycogène partiellement phosphorolysée, catalysé par une transférase et une α-1,6-glucosidase, qui permettra une dégradation plus poussée ; enfin la conversion par la phosphoglucomutase du glucose 1-phosphate en glucose 6-phosphate qui rejoindra les voies métaboliques présentées antérieurement : glycolyse, voie des pentoses phosphate et homéostasie du glucose sanguin.

La phosphorylase catalyse l'élimination séquentielle de résidus glucosyle à partir de l'extrémité non réductrice d'une molécule de glycogène en clivant la liaison glycosidique 1-4. Le $\Delta G°'$ de la réaction est faible et la réaction est aisément réversible mais, dans la cellule, la réaction s'effectue dans le sens de la phosphorolyse en raison d'une beaucoup plus grande concentration de phosphate inorganique que de glucose 1-phosphate (*Figure 8.15B*). La réaction de phosphorolyse est importante en raison de ses implications physiologiques. Elle conduit directement à un hexose phosphorylé qui, ne pouvant diffuser hors de la cellule, est susceptible d'entrer très rapidement dans les voies métaboliques après avoir été isomérisé en glucose 6-phosphate.

La glycogène phosphorylase est un dimère de deux sous-unités identiques de 97 kDa possédant chacune un site catalytique processif connecté à un site de liaison au glycogène par une étroite crevasse susceptible d'accueillir quatre ou cinq résidus glucosyl ; de plus, chaque sous-unité présente un site de phosphorylation au niveau d'une sérine et des sites de liaison pour des effecteurs allostériques.

Le mécanisme catalytique de la glycogène phosphorylase (*Figure 8.15C*) fait intervenir une molécule d'orthophosphate inorganique qui donne un proton à l'atome d'oxygène de la liaison α-glycosidique terminale du glycogène. Un atome d'oxygène de l'orthophosphate inorganique déprotoné attaque l'atome de carbone C-1 du carbocation intermédiaire pour donner le glucose 1-phosphate avec conservation de la configuration α au niveau du C-1. Au sein de l'enzyme, le groupe 5'-phosphate du coenzyme pyridoxal phosphate (PLP) lié à la protéine par une base de Schiff avec un résidu lysine agit en synergie avec l'orthophosphate en jouant le rôle de donneur puis d'accepteur de proton, selon un mécanisme de catalyse acide-base générale.

Figure 8.16

H_2O

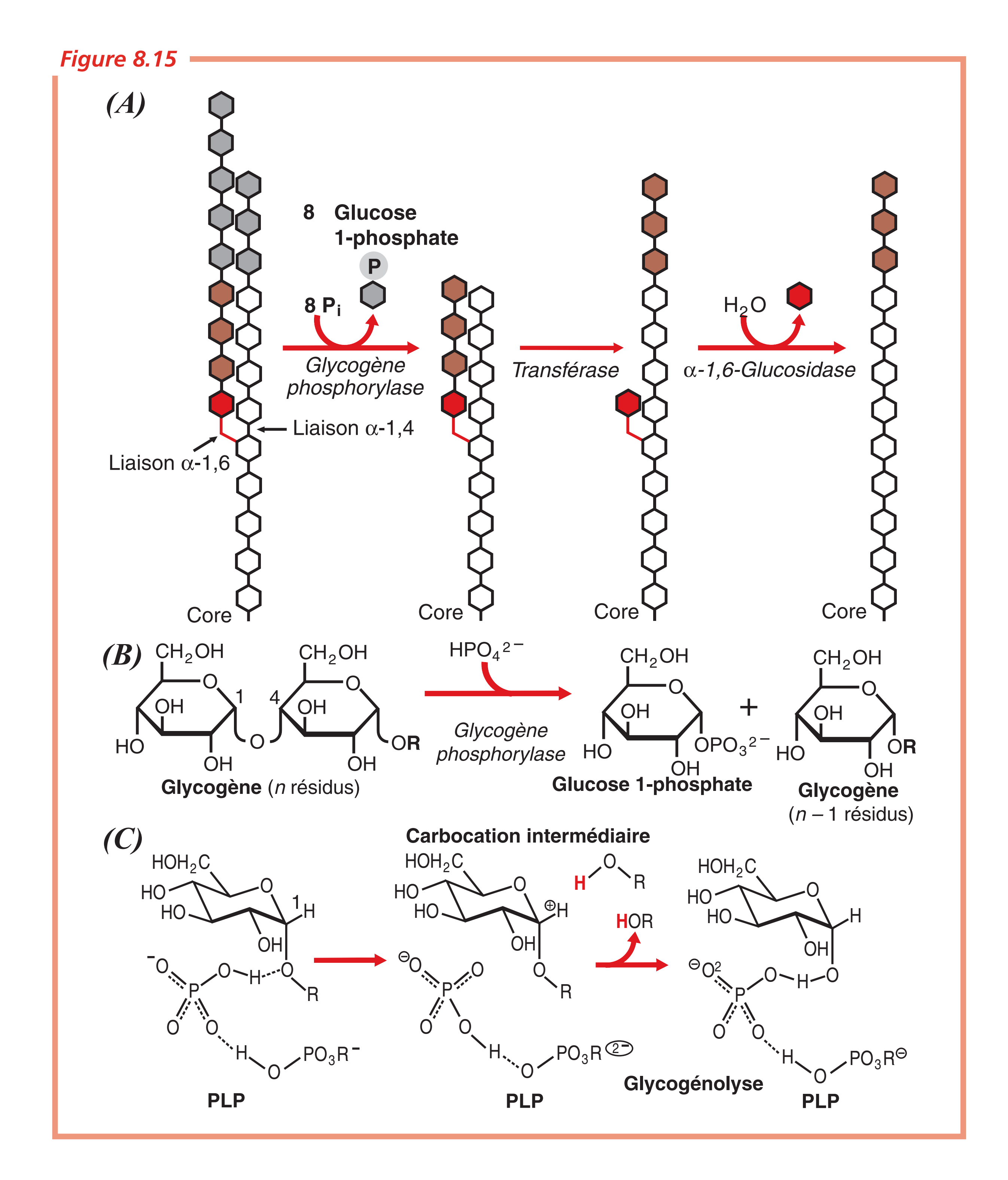
α-1,6-Glucosidase

Glycogène (*n* résidus)

Glucose

Glycogène (*n* – 1 résidus)

Figure 8.15



La phosphorylase ne peut pas cliver les liaisons α-1,4 situées à moins de quatre résidus d'un point de branchement et, pour continuer à être dégradé, le glycogène doit être remodelé grâce à l'intervention de deux enzymes, une transférase qui déplace en bloc trois résidus glucosyle vers une autre branche et une α-1,6-glucosidase, ou enzyme débranchant (*Figure 8.16*), qui hydrolyse le premier résidu de la branche avec formation de glucose libre.

Enfin, la phosphoglucomutase convertit le glucose 1-phosphate en glucose 6-phosphate grâce à une phosphosérine de son site actif qui transfère son groupe phosphoryle sur le glucose 1-phosphate avec formation de glucose 1,6-bisphosphate ; ce dernier régénère l'enzyme en donnant son groupe phosphoryle en C-1 à la sérine du site actif.

Régulation de la glycogénolyse

L'activité de la glycogène phosphorylase est régulée par de multiples mécanismes intriqués mettant en jeu divers effecteurs allostériques qui signalent l'état énergétique de la cellule et faisant intervenir une phosphorylation réversible en réponse aux stimulations hormonales de l'insuline, du glucagon et de l'adrénaline (*Figure 8.17A*). Ainsi, la glycogène phosphorylase se présente sous la forme *a* phosphorylée, pleinement active, ou sous la forme *b* non phosphorylée, habituellement inactive ; la forme *b* est convertie en forme *a* par phosphorylation d'un résidu sérine par la phosphorylase kinase et, inversement, la forme *a* est convertie en forme *b* par la protéine phosphatase 1. De plus, pour chaque forme, il s'établit un équilibre entre un état relâché *R* actif et un état tendu *T* moins actif. Cet équilibre est en faveur de l'état *R* pour la phosphorylase *a*, de l'état *T* pour la phosphorylase *b*. La transition de l'état *T* à l'état *R* est associée au déplacement d'hélices α qui bloquaient en partie le site catalytique.

La glycogène phosphorylase ayant pour rôle de fournir du glucose au muscle lorsqu'il effectue un travail important ou au foie lorsqu'il doit maintenir constant le taux de glucose sanguin, il y a deux isozymes de la glycogène phosphorylase, musculaire et hépatique, dont les séquences des aminoacides sont identiques à 90 % et les mécanismes de régulation différents.

Glycogène phosphorylase musculaire. Dans le muscle, la forme *b* prédomine et la position de l'équilibre entre les formes *T* et *R* dépend des conditions cellulaires. La phosphorylase *b* musculaire n'est active qu'en présence de concentrations élevées d'AMP qui traduit le besoin d'énergie de la cellule et se fixe sur le site de liaison des nucléotides, stabilisant alors l'état *R* (*Figure 8.17B*) ; l'ATP est un effecteur allostérique compétitif, et donc négatif, et le glucose 6-phosphate favorise l'état *T* par rétroinhibition. Dans le muscle au repos, presque tout l'enzyme est sous la forme *b* inactive mais, lors d'un exercice, une augmentation du taux d'AMP conduit à son activation. Par ailleurs, l'adrénaline ou une stimulation électrique conduisent à la forme *a* phosphorylée active, tandis que l'insuline diminue l'activité de la phosphorylase ; ces deux effets physiologiques conduisent à une production accrue de glucose utilisable pour l'obtention d'énergie.

Glycogène phosphorylase hépatique. La régulation de la glycogène phosphorylase hépatique diffère considérablement de celle de la glycogène phosphorylase musculaire ; c'est la phosphorylase *a* qui est sensible à la transition *T-R* induite par le glucose ; ce dernier déplace l'équilibre allostérique de la forme *a* de l'état *R* vers l'état *T*, désactivant ainsi l'enzyme (*Figure 8.17C*). Lorsque le glucose est en quantité suffisante dans la cellule, il n'est nul besoin d'en obtenir par glycogénolyse. Par ailleurs, dans le foie, le glucagon augmente la dégradation du glycogène par la glycogène phosphorylase alors que l'insuline la diminue.



Figure 8.17

(A)
Phosphorylase b (peu active)
Site actif
Phosphorylase a (active)
État R
ATP ADP
P
P
État T
ATP ADP
P
P
(B)
Phosphorylase b (muscle)
Site de liaison des nucléotides
AMP
ATP
Glucose 6-phosphate
État T
État R
(C)
Phosphorylase a (foie)
Site de liaison du glucose
P
P
Glucose
État T
État R

GLUCONÉOGENÈSE

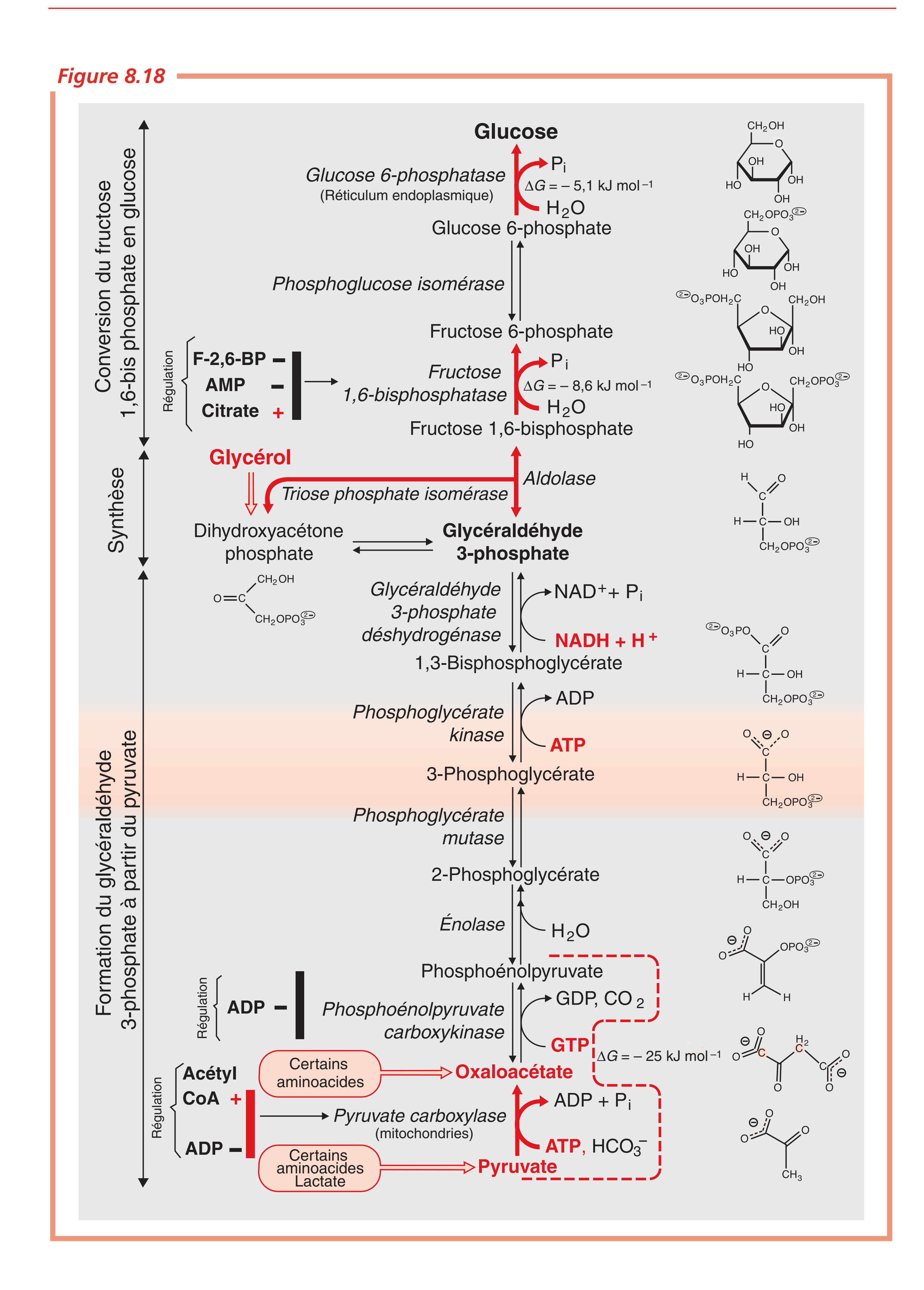
Dans la plupart des organismes, le glucose est un important métabolite énergétique mais, chez les animaux, il est d'une absolue nécessité car il est la seule source d'énergie pour les tissus embryonnaires et pour certains organes tels que le cerveau et le système nerveux, les érythrocytes, la médullo-surrénale ou le testicule. Ainsi, un homme adulte a besoin de 160 grammes de glucose par jour, dont 120 grammes pour le cerveau. Le glucose peut être synthétisé à partir de précurseurs non glucidiques, tels que le lactate, le pyruvate, certains aminoacides ou le glycérol par la voie de la gluconéogenèse (ou néoglucogenèse) (*Figure 8.18*) présente dans le cytosol de la plupart des organismes : micro-organismes, champignons, végétaux ou animaux ; chez ces derniers, elle s'effectue essentiellement dans le foie. Les réactions de la gluconéogenèse sont les mêmes dans tous les organismes mais la régulation de la voie diffère selon les espèces et les tissus.

Dans la glycolyse, le glucose est converti en pyruvate au cours d'une suite de dix réactions ; dans la gluconéogenèse, le pyruvate conduit au glucose grâce à un ensemble de dix réactions également. Cependant, la glycolyse et la néoglucogenèse ne sont pas rigoureusement l'inverse l'une de l'autre ; seules sept des réactions sont communes. En effet, trois réactions de la glycolyse, catalysées par des kinases et dont le ΔG est largement négatif, sont physiologiquement irréversibles : la phosphorylation du glucose en glucose 6-phosphate par l'hexokinase, la phosphorylation du fructose 6-phosphate en fructose 1,6-bisphosphate par la phosphofructokinase 1 et la conversion du phosphoénolpyruvate en pyruvate par la pyruvate kinase. Dans la gluconéogenèse, ces trois étapes sont contournées par un groupe spécifique d'enzymes qui catalysent des réactions suffisamment exergoniques pour être effectivement irréversibles dans le sens de la synthèse du glucose.

Conversion du pyruvate en phosphoénolpyruvate

Le pyruvate est tout d'abord transféré du cytosol vers les mitochondries où il est carboxylé en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase aux dépens de l'ATP. La pyruvate carboxylase est un enzyme allostérique exclusivement mitochondrial dont le domaine N-terminal fixe l'ATP et le domaine C-terminal la carboxybiotine, forme activée du CO_2 ; elle est activée allostériquement par l'acétyl CoA et inhibée par l'ADP ; c'est là un important mécanisme de contrôle physiologique de la gluconéogenèse. Grâce à une navette où il apparaît transitoirement sous forme de malate, l'oxaloacétate passe dans le cytosol où il est l'objet d'une décarboxylation phosphorylante en phosphoénolpyruvate catalysée par la phosphoénolpyruvate carboxykinase aux dépens du GTP. Deux liaisons phosphate riches en énergie, l'une venant de l'ATP, l'autre du GTP, soit environ 50 kJ mol^{-1}, sont donc consommées pour phosphoryler une molécule de pyruvate en phosphoénolpyruvate. Dans les conditions physiologiques, le ΔG réel est de – 25 kJ mol^{-1}, ce qui rend la conversion effectivement irréversible. Les aminoacides glucoformateurs, qui peuvent conduire au pyruvate ou à l'oxaloacétate, sont susceptibles de contribuer à la gluconéogenèse.

Figure 8.18


Conversion du fructose 1,6-bis phosphate en glucose
Synthèse
Formation du glycéraldéhyde 3-phosphate à partir du pyruvate
Glucose
Glucose 6-phosphatase
(Réticulum endoplasmique)
P_i
$\Delta G = -5,1$ kJ mol^{-1}
H_2O
Glucose 6-phosphate
Phosphoglucose isomérase
Fructose 6-phosphate
Régulation
F-2,6-BP –
AMP –
Citrate +
Fructose 1,6-bisphosphatase
$\Delta G = -8,6$ kJ mol^{-1}
Fructose 1,6-bisphosphate
Glycérol
Aldolase
Triose phosphate isomérase
Dihydroxyacétone phosphate
Glycéraldéhyde 3-phosphate
Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
$NAD^+ + P_i$
$NADH + H^+$
1,3-Bisphosphoglycérate
Phosphoglycérate kinase
ADP
ATP
3-Phosphoglycérate
Phosphoglycérate mutase
2-Phosphoglycérate
Énolase
H_2O
Phosphoénolpyruvate
ADP –
Phosphoénolpyruvate carboxykinase
GDP, CO_2
GTP
$\Delta G = -25$ kJ mol^{-1}
Acétyl CoA +
ADP –
Certains aminoacides
Oxaloacétate
Pyruvate carboxylase
(mitochondries)
ADP + P_i
ATP, HCO_3^-
Certains aminoacides Lactate
Pyruvate

Hydrolyse du fructose 1,6-bisphosphate en fructose 6-phosphate

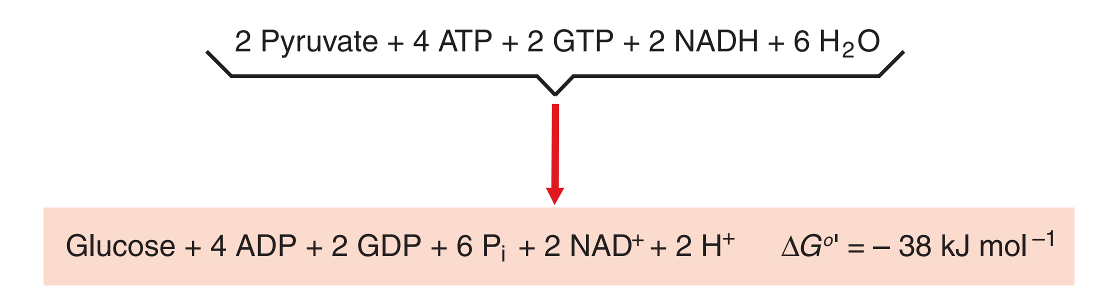
La conversion du fructose 1,6-bisphosphate en fructose 6-phosphate est une deuxième étape irréversible catalysée par la fructose 1,6-bisphosphatase, enzyme allostérique activé par le citrate et inhibé par le fructose 2,6-bisphosphate et l'AMP.

Passage du glucose 6-phosphate au glucose

Dans la plupart des tissus, la gluconéogenèse s'arrête au niveau du glucose 6-phosphate. Cependant, dans ceux qui ont en charge le maintien de l'homéostasie du glucose sanguin, essentiellement le foie et à un moindre degré le rein, du glucose libre est formé à partir du glucose 6-phosphate par une simple réaction d'hydrolyse catalysée par la glucose 6-phosphatase du réticulum endoplasmique.

Bilan de la gluconéogenèse

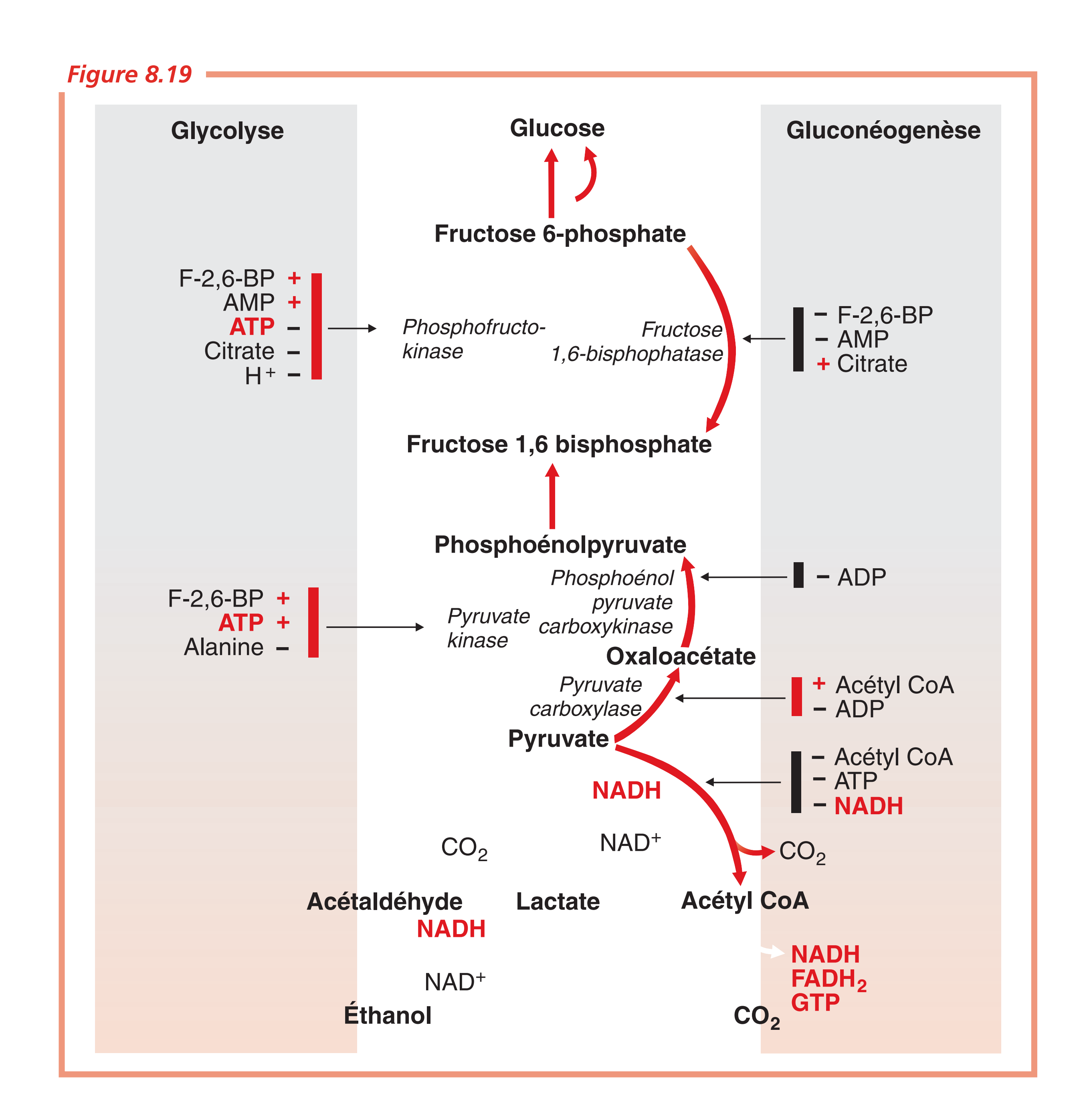
La stœchiométrie de la gluconéogenèse s'établit ainsi :



La gluconéogenèse est couplée à l'hydrolyse de 4 ATP et de 2 GTP : six molécules de nucléosides triphosphate sont donc nécessaires pour synthétiser une molécule de glucose à partir du pyruvate et transformer un processus énergétiquement défavorable en processus énergétiquement favorable par couplage de réactions d'hydrolyse de molécules de haut potentiel de transfert de phosphoryle.

Comparaison de la glycolyse et de la gluconéogenèse

La glycolyse et la gluconéogenèse sont réciproquement régulées (*Figure 8.19*) de telle façon que lorsqu'une voie est active l'autre soit inhibée. Cette régulation, largement fonction du niveau énergétique de la cellule, s'exerce au niveau des enzymes qui catalysent les réactions fortement exergoniques telles que les conversions pyruvate-phosphoénolpyruvate, fructose 6-phosphate-fructose 1,6-bisphosphate et glucose-glucose 6-phosphate. Elle s'effectue selon un mécanisme allostérique pour les deux premières réactions et un mécanisme de contrôle de la concentration du substrat pour la dernière réaction de la gluconéogenèse.



DEVENIR DU PYRUVATE

Le pyruvate peut être converti en glucose et en glycogène par la gluconéogenèse ou oxydé en acétyl CoA pour produire de l'énergie (p. 222). Le premier enzyme de chaque voie est régulé allostériquement par l'acétyl CoA qui stimule la pyruvate carboxylase et inhibe le complexe pyruvate déshydrogénase.

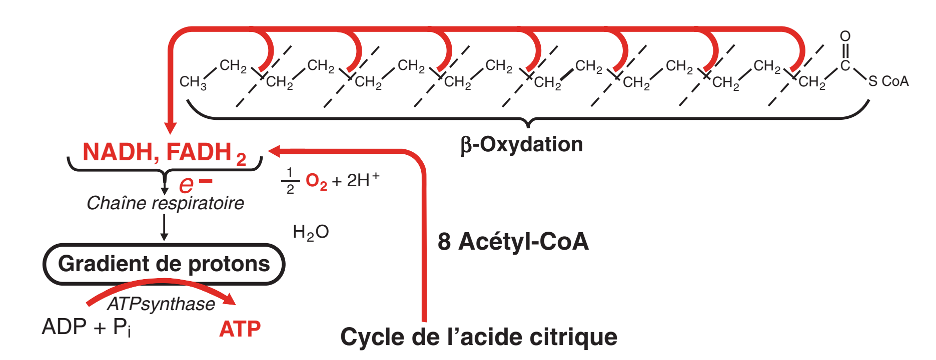
D'autres molécules d'ATP seront synthétisées à partir du pyruvate, dans les mitochondries, par un processus fondamentalement différent, la phosphorylation oxydative, comme il sera montré ultérieurement (p. 237). Remarquons dès à présent que ce processus utilisera les 2 molécules de NADH formées lors de la glycolyse pour synthétiser de l'ATP.

Chapitre 9

Métabolisme des acides gras : β-oxydation et biosynthèse

Les acides gras ont un rôle essentiel dans d'importants processus structuraux tels que la biosynthèse des phospholipides et des glycolipides qui constituent les membranes cellulaires ou l'adressage vers les membranes de nombreuses protéines auxquelles ils se fixent par covalence. Ils participent à la biosynthèse d'hormones et de messagers intracellulaires. Enfin, ils interviennent dans la production d'énergie sous forme d'ATP.

Les acides gras ont été sélectionnés au cours de l'Évolution parce qu'ils représentent une forme très concentrée d'énergie ; ils sont en effet très réduits et anhydres, contrairement aux glucides et aux protéines beaucoup plus polaires et hydratés. Ainsi, chez un homme adulte dont les réserves énergétiques sont d'environ 500 000 kJ, 80 % viennent des triglycérides, 19,5 % des protéines, essentiellement musculaires, et 0,5 % du glycogène.



Au sein des mitochondries, les acyl CoA gras sont soumis à une séquence répétitive de quatre réactions, dite β-oxydation, qui conduit à la formation de molécules d'acétyl CoA, de NADH et de $FADH_2$. Les liaisons entre groupes méthylène $–CH_2–$ sont relativement stables et la β-oxydation est un puissant mécanisme qui permet de les rompre. L'acétyl CoA formé est susceptible de rejoindre le cycle de l'acide citrique où il est oxydé avec création de nouvelles molécules de NADH et de $FADH_2$. Toutes les molécules de NADH et de $FADH_2$ ainsi créées pourront céder leurs électrons de haut potentiel de transfert dans la chaîne respiratoire mitochondriale et concourir à la création d'un gradient de protons, apportant ainsi l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de P_i par l'ATP synthase mitochondriale.

Dans ce chapitre, nous envisagerons le métabolisme des acides gras en tant que molécules énergétiques. Nous étudierons successivement l'oxydation puis la biosynthèse des acides gras car ces deux processus sont régulés réciproquement, en particulier en réponse à certaines hormones.

ORIGINE ET TRANSPORT DES ACIDES GRAS

Chez les animaux, les acides gras, qui résultent de l'hydrolyse des graisses des aliments par les lipases pancréatiques, sont transportés par la lymphe, puis par le sang, des cellules intestinales vers les tissus ; ils sont alors sous forme d'esters de glycérol, ou triglycérides (triacylglycérols), eux-mêmes inclus dans des lipoprotéines dénommées chylomicrons (*Figure 9.1A*). Au contact des lipoprotéine lipases membranaires, ces derniers auront leurs triglycérides hydrolysés et les acides gras libérés pourront pénétrer dans les cellules où ils seront oxydés dans les mitochondries pour produire de l'énergie, comme dans les myocytes, ou bien mis en réserve sous forme de triglycérides, comme dans les adipocytes.

Avant de pénétrer dans la matrice mitochondriale pour y être oxydés, les acide gras cytosoliques sont tout d'abord activés en acyl CoA au cours d'une réaction en deux étapes, catalysée par l'acyl CoA synthétase, où intervient l'ATP (*Figure 9.1B*). L'acide gras réagit avec l'ATP pour former un acyl adénylate intermédiaire qui est ensuite attaqué par le groupe sulfhydryle du CoA pour donner l'acyl CoA. Les deux réactions sont réversibles et la constante d'équilibre est proche de 1, mais l'hydrolyse du PP_i en deux molécules de P_i rend la formation de l'acyl CoA irréversible.

Au niveau de la membrane mitochondriale externe, au cours d'une réaction catalysée par la carnitine acyltransférase I, le groupe acyl est transféré de l'atome de soufre du CoA au groupe hydroxyle de la carnitine, qui est un zwitterion, et les acyl CoA sont convertis en acyl carnitine. C'est sous cette forme que les acides gras traversent les membranes mitochondriales sous l'action d'une translocase et arrivent dans la matrice où ils sont à nouveau conjugués au CoA au cours d'une réaction catalysée par la carnitine acyltransférase II (*Figure 9.1C*).

Figure 9.1

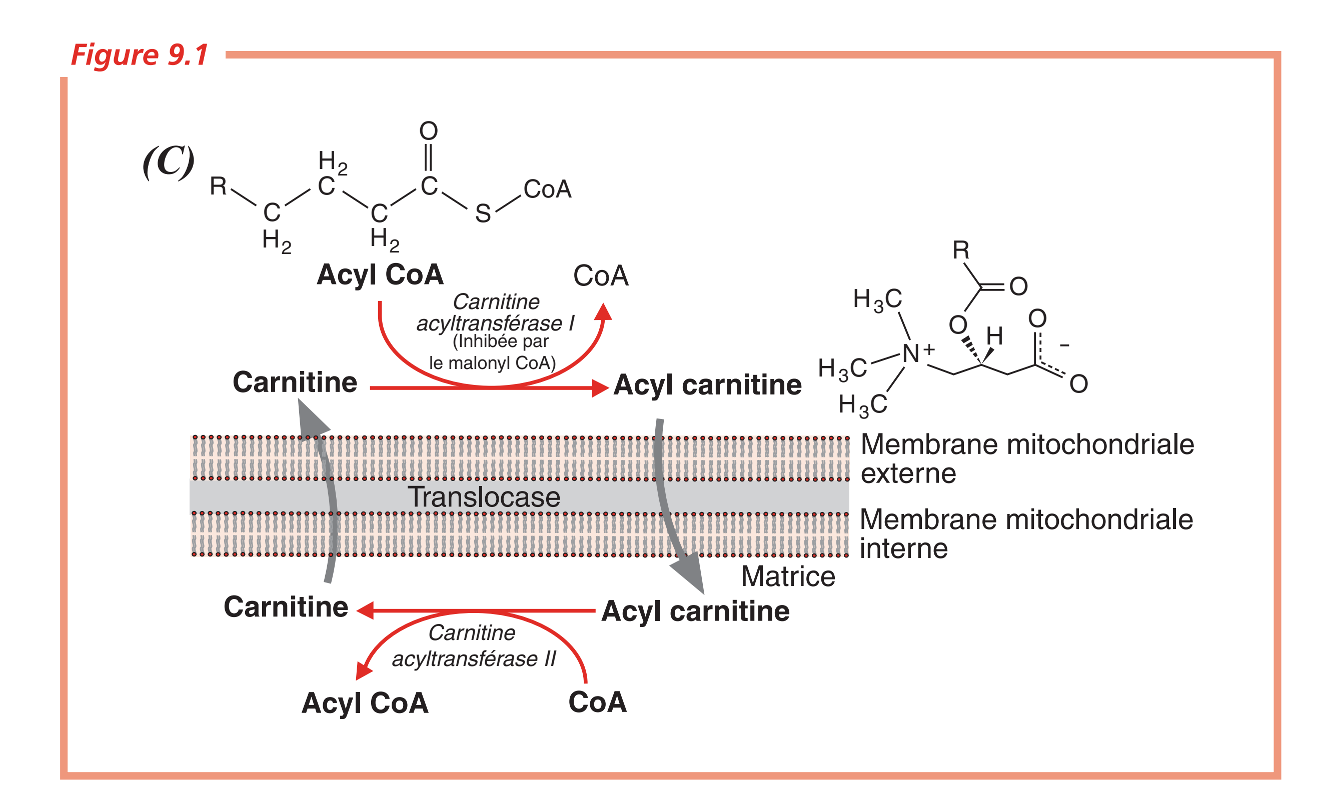



Figure 9.1

Figure 9.1

(A)
Triglycérides
H_2O
Lipases
Monoglycérides + Acides gras
Lumière intestinale
Cellule épithéliale
Triglycérides
Cholestérol et apolipoprotéines
Acides gras
Chylomicrons
Acides gras
Adipocyte
Capillaire
Myocyte
(B)
ATP
AMP + PP_i
$R-COO^-$ + HS — CoA ⇌ R-CO-S—CoA
Acyl CoA synthétase
$R-COO^-$ + ATP ⇌ R-CO-AMP + PP_i
Acide gras
Acyl adénylate
R-CO-AMP + HS — CoA ⇌ R-CO-S—CoA + AMP
Acyl CoA

β-OXYDATION MITOCHONDRIALE DES ACIDES GRAS

Un tour de β-oxydation des acides gras saturés fait intervenir successivement une oxydation, une hydratation, une seconde oxydation et une thiolyse (*Figure 9.2*).

La première réaction d'oxydation, réalisée par une acyl CoA déshydrogénase à FAD, conduit à un *trans*-Δ^2-énoyl CoA. Les électrons sont immédiatement transmis à une flavoprotéine de transport d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale dénommée ETF (de *electron-transferring flavoprotein*), qui les transfère à son tour à une protéine fer-soufre, l'ETF-ubiquinone réductase. L'ubiquinone est réduite en ubiquinol qui délivre ses deux électrons de haut potentiel au second site de pompage de protons de la chaîne respiratoire mitochondriale, la Q-cytochrome c réductase, ce qui conduira à la création de 1,5 molécule d'ATP par molécule de $FADH_2$ (p. 248). L'acyl CoA déshydrogénase de la β-oxydation des acides gras est analogue à la succinate déshydrogénase du cycle de l'acide citrique (p. 230) ; dans les deux réactions, l'enzyme est lié à la membrane interne, une double liaison est introduite dans un acide carboxylique entre les carbone α et β, FAD est l'accepteur d'électrons et ces derniers entrent dans la chaîne respiratoire pour être transférés à O_2 avec la synthèse concomitante de 1,5 molécule d'ATP.

L'étape suivante est l'hydratation stéréospécifique du *trans*-Δ^2-énoyl CoA avec formation d'un L-3-hydroxyacyl CoA, catalysée par l'énoyl CoA hydratase. Cette réaction est analogue à l'hydratation du fumarate par la fumarase dans le cycle de l'acide citrique.

La seconde réaction d'oxydation, réalisée par une L-3-hydroxyacyl CoA déshydrogénase où NAD^+ est l'accepteur d'électrons, convertit le groupe hydroxyle en C-3 en un groupe carbonyle et conduit à un β-cétoacyl CoA. NADH et H^+ sont formés. Le NADH délivre ses deux électrons de haut potentiel au premier site de pompage de la chaîne respiratoire mitochondriale, la NADH Q-oxydoréductase, ce qui conduira à la création de 2,5 molécules d'ATP par molécule de NADH (p. 244). Cette réaction est analogue à celle de la malate déshydrogénase du cycle de l'acide citrique.

La quatrième et dernière réaction, catalysée par l'acyl CoA acétyltransférase, plus couramment appelée β-cétothiolase, est le clivage thiolytique du β-cétoacyl CoA par une molécule de CoA qui donne une molécule d'acétyl CoA et un acyl CoA raccourci de deux atomes de carbone. Ce dernier est prêt pour subir un autre cycle d'oxydation.

Trois acyl CoA déshydrogénases interviennent dans l'oxydation des acides gras : une pour les acyl CoA contenant de 12 à 18 atomes de carbone, une pour les acyl CoA à chaîne plus courte, de 14 à 4 carbones et enfin une pour les acyl CoA de 4 à 6 carbones. En revanche, l'énoyl CoA hydratase, la L-3-hydroxyacyl CoA déshydrogénase et la β-cétothiolase ont une spécificité beaucoup plus large par rapport à la longueur des acyl CoA.

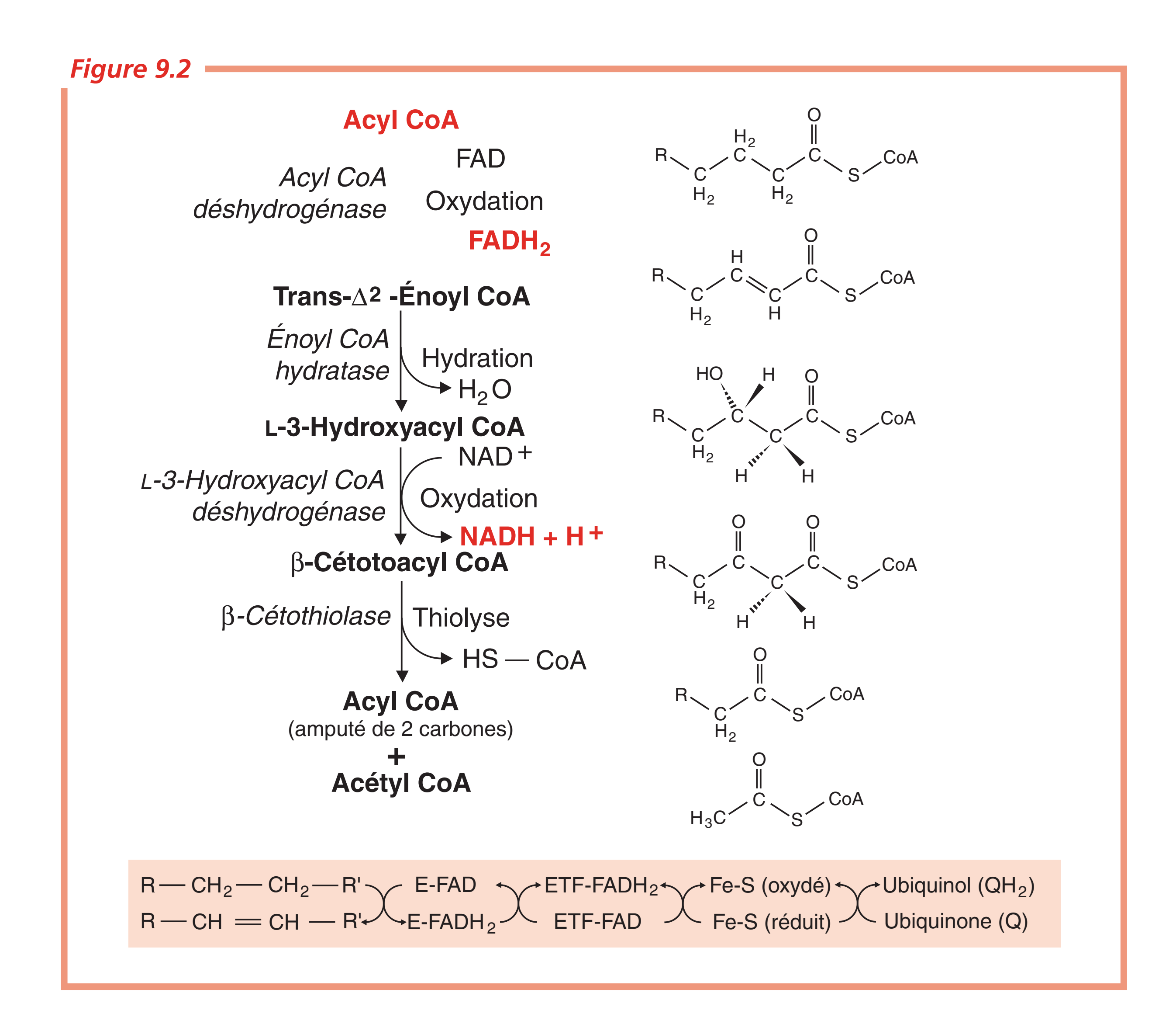


Figure 9.2

Le bilan de l'oxydation d'un acyl CoA en C_{16} tel que le palmityl CoA s'établit donc ainsi :

$$\text{Palmityl CoA} + 7\ \text{FAD} + 7\ \text{NAD}^+ + 7\ \text{CoA} + 7\ H_2O \rightarrow 8\ \text{acétyl CoA} + 7\ \text{FADH}_2 + 7\ \text{NADH} + 7\ H^+$$

Les 8 molécules d'acétyl CoA donneront 80 molécules d'ATP, les 7 molécules de FADH2 10,5 et les 7 molécules de NADH 17,5, soit un total de 108 auquel il faudra soustraire l'équivalent de 2 ATP utilisé pour l'activation du palmitate. L'oxydation complète d'une molécule de palmitate donne donc 106 molécules d'ATP. De plus, la réduction de O_2 par le NADH consomme un H^+ par molécule de NADH :

$$\text{NADH} + H^+ + 1/2\ O_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + H_2O.$$

L'oxydation des acides gras apporte donc énergie métabolique, chaleur et eau, autant d'éléments indispensables à la survie des animaux privés de nourriture et éventuellement de boisson (jeûne, hibernation, vol de longue durée).

Par ailleurs, bien que la plupart des acides gras soient oxydés dans les mitochondries, ils peuvent aussi l'être dans les peroxysomes selon une voie spécifique ; cependant, leur oxydation s'arrête alors au niveau de l'octanyl CoA.

FORMATION ET UTILISATION DES CORPS CÉTONIQUES

Pour que l'acétyl CoA entre dans le cycle de l'acide citrique, il est nécessaire que de l'oxaloacétate soit disponible pour la formation du citrate. Pour que cette condition soit réalisée, la dégradation des glucides doit être correctement réalisée ; dans le cas contraire, la concentration de l'oxaloacétate est abaissée car ce dernier est normalement formé à partir du pyruvate, produit de la glycolyse, par la pyruvate carboxylase. « Les graisses brûlent au feu des hydrates de carbone. »

Au cours du jeûne ou dans le diabète, l'oxaloacétate est utilisé par la gluconéogenèse pour former du glucose et il est donc peu disponible pour sa condensation avec l'acétyl CoA. Dans ces conditions, ce dernier est dirigé vers la formation, dans les mitochondries hépatiques, de corps cétoniques : acétoacétate, D-3-hydroxybutyrate et acétone (*Figure 9.3*).

Les corps cétoniques sont des molécules importantes du métabolisme énergétique. Le myocarde et le cortex rénal utilisent l'acétoacétate comme source d'énergie, tandis que, pour les globules rouges et le cerveau, le glucose est normalement la principale molécule énergétique. Cependant, lors du jeûne ou du diabète, le cerveau peut s'adapter à l'utilisation de l'acétoacétate.

De plus, les corps cétoniques sont une forme transportable hydrosoluble d'unités acétyle qui jouent un rôle régulateur de la lipolyse. Une concentration sanguine élevée d'acétoacétate conduit à une diminution de la lipolyse dans les adipocytes.

BIOSYNTHÈSE CYTOSOLIQUE DES ACIDES GRAS

Les acides gras ne sont pas biosynthétisés dans les mitochondries par une voie qui serait l'inverse de celle de leur dégradation. Ils sont synthétisés dans le cytosol par un ensemble de réactions entièrement distinctes ; les intermédiaires y sont liés par covalence au groupe sulfhydryle d'une protéine de transport d'acyles, ou ACP (de *acyl carrier protein*), et non pas au CoA ; les enzymes assumant la synthèse y sont unis en une seule chaîne polypeptidique dénommée acide gras synthase où l'unité flexible phosphopantéthéinyle de l'ACP transporte le substrat d'un site à un autre ; l'élongation y est assurée par l'addition séquentielle d'unités dicarbonées apportées par le malonyl ACP ; enfin le réducteur y est le NADPH, et non pas le NADH. L'élongation s'arrête après la formation du palmitate.

Figure 9.3

H_3C S CoA O
H_3C S CoA O
3-Cétothiolase
CoA
H_3C S CoA O O
Acétoacétyl CoA
H_3C S CoA O
+
H_2O
Hydroxyméthylglutaryl CoA synthase
CoA
O S CoA O HO CH_3 O
3-Hydroxy-3-méthyl glutaryl CoA
Enzyme de clivage de l'hydroxyméthylglutaryle CoA
H_3C S CoA O
O CH_3 O O
Acétoacétate
H^++ NADH
NAD^+
H_3C CH_3 O
Acétone
O CH_3 O H OH
D-3-Hydroxybutyrate

La biosynthèse des acides gras (*Figure 9.4*) commence par la carboxylation d'un acétyl CoA en malonyl CoA catalysée par l'acétyl CoA carboxylase, enzyme contenant un groupe prosthétique biotine. Un groupe carboxybiotine est formé aux dépens de l'hydrolyse d'un ATP et le CO_2 ainsi activé est transféré à l'acétyl CoA pour former le malonyl CoA. Cette réaction irréversible engage la synthèse des acides gras et l'acétyl CoA carboxylase est l'enzyme régulateur essentiel du métabolisme des acides gras.

La synthèse des acides gras saturés s'effectue à partir de l'acétyl CoA, du malonyl CoA et du NADPH grâce à un système enzymatique dénommé acide gras synthase où sont associés tous les enzymes nécessaires aux réactions.

Le cycle d'élongation commence par la formation d'acétyl ACP et de malonyl ACP à partir d'acétyl CoA et de malonyl CoA catalysée par l'acétyl transacylase et la malonyl transacylase, respectivement. Les acides gras à nombre impair d'atomes de carbone sont synthétisés à partir du propionyl ACP.

L'acétyl ACP et de malonyl ACP forment l'acétoacétyl ACP au cours d'une réaction catalysée par l'enzyme de condensation acyl-malonyl ACP. Une unité à quatre atomes de carbone est formée et le CO_2 est libéré. La décarboxylation du malonyl ACP favorise la réaction.

Les trois étapes suivantes permettent la réduction du groupe carbonyle cétonique en C-3 en un groupe méthylène ; s'agissant d'une biosynthèse, l'agent de réduction est le NADPH et non pas le NADH. Tout d'abord, l'acétoacétyl ACP est réduit en D-3-hydroxybutyryl ACP puis ce dernier est déshydraté pour former un crotonyl ACP qui est un *trans*-Δ^2-énoyl ACP. Enfin, toujours aux dépens du NADPH, le crotonyl ACP est réduit en butyryl ACP.

Les cycles d'élongation se poursuivent jusqu'à la formation d'un C_{16}-acyl ACP. Ce dernier est alors hydrolysé en palmitate et ACP par une thioestérase qui agit comme régulateur de la longueur des acides gras.

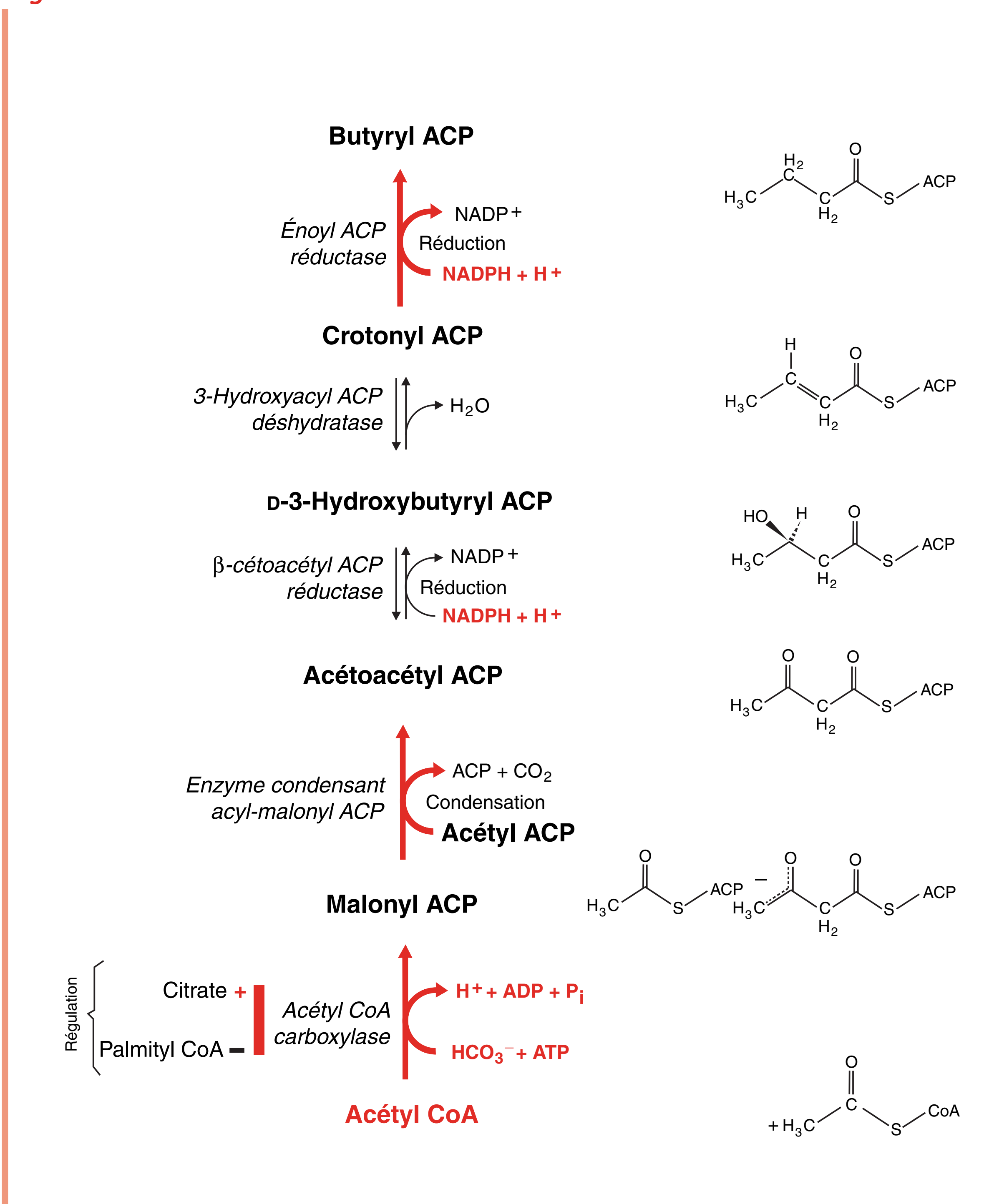
Le bilan de la synthèse d'un acide gras en C_{16} tel que le palmitate s'établit donc ainsi :

① Acétyl CoA + 7 malonyl CoA + 14 NADPH + 20 H^+
$$\downarrow$$
Palmitate + 7 CO_2 + 14 $NADP^+$ + 8 CoA + 6 H_2O

② 7 Acétyl CoA + 7 CO_2 + ATP
$$\downarrow$$
7 Malonyl CoA + 7 ADP + 7 P_i + 14 H^+

③ 8 Acétyl CoA + 7 ATP + 14 NADPH + 6 H^+
$$\downarrow$$
Palmitate + 14 NADP + 8 CoA + 6 H_2O + 7 ADP + 7 P_i

Figure 9.4


Butyryl ACP
Énoyl ACP réductase
NADP+
Réduction
NADPH + H+
Crotonyl ACP
3-Hydroxyacyl ACP déshydratase
H_2O
D-3-Hydroxybutyryl ACP
β-cétoacétyl ACP réductase
NADP+
Réduction
NADPH + H+
Acétoacétyl ACP
Enzyme condensant acyl-malonyl ACP
ACP + CO_2
Condensation
Acétyl ACP
Malonyl ACP
Régulation
Citrate +
Palmityl CoA –
Acétyl CoA carboxylase
H^+ + ADP + P_i
HCO_3^- + ATP
Acétyl CoA
ACP
CoA

CONTRÔLE DU MÉTABOLISME DES ACIDES GRAS

Afin de répondre aux besoins physiologiques, le métabolisme des acides gras est soumis à un contrôle très précis où l'acétyl CoA carboxylase joue un rôle clé. L'insuline stimule la synthèse de acides gras en activant la carboxylase, tandis que le glucagon et l'adrénaline ont un effet inverse. Le citrate, qui signale que les modules nécessaires à la production d'énergie et aux synthèses cellulaires sont abondants, active la carboxylase, tandis que les acyl CoA et l'AMP l'inhibent.

La régulation de l'acétyl CoA carboxylase est effectuée par phosphorylation réversible au niveau d'un résidu sérine : la phosphorylation par une protéine kinase AMP-dépendante (AMPK) l'inhibe, tandis que la déphosphorylation par une protéine phosphatase l'active (*Figure 9.5*) ; l'AMPK est elle-même activée par l'AMP et inhibée par l'ATP. Ainsi, la carboxylase est activée quand la charge énergétique est faible.

L'insuline stimule la déphosphorylation de la carboxylase. Le glucagon et l'adrénaline activent la protéine kinase A qui, à son tour, inhibe la phosphatase en la phosphorylant ; ainsi, ces hormones cataboliques arrêtent la synthèse des acides gras.

Le citrate stimule allostériquement la carboxylase. Un taux élevé de citrate traduit le fait que les unités dicarbonées et l'ATP sont disponibles pour la biosynthèse des acides gras.

La synthèse et la dégradation des acides gras sont réciproquement régulées de telle façon qu'elles ne soient pas actives simultanément. Ainsi, au cours du jeûne, le glucagon et l'adrénaline activent la lipolyse tandis que l'insuline l'inhibe.

Le contrôle hormonal de l'acétyl CoA carboxylase rappelle celui de la glycogène synthase (p. 178).

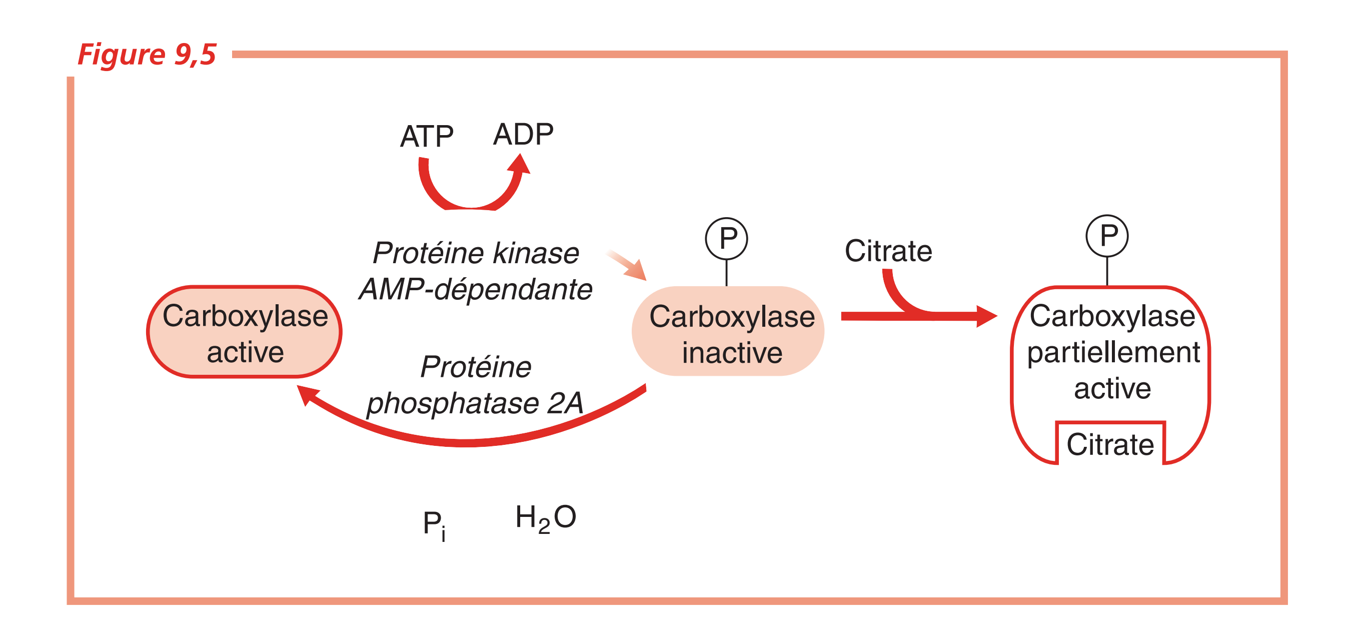


Figure 9,5
ATP
ADP
Protéine kinase AMP-dépendante
Carboxylase active
P
Carboxylase inactive
Citrate
P
Carboxylase partiellement active
Citrate
Protéine phosphatase 2A
P_i
H_2O

Chapitre 10

Métabolisme des aminoacides : désamination oxydative

Les aminoacides, en tant que tels, sont tout d'abord utilisés comme modules élémentaires pour la biosynthèse des protéines, mais aussi comme source d'azote pour la biosynthèse d'autres molécules azotées telles que les bases puriques ou pyrimidiques nucléotidiques. Les aminoacides en excès sont soumis à une désamination conduisant à la formation d'un ion ammonium (NH_4^+) et d'un α-cétoacide.

L'ion ammonium est toxique pour les cellules et doit être éliminé. Chez les Invertébrés et les Vertébrés aquatiques, qui sont ammoniotéliques, l'ion ammonium est excrété dans le milieu aqueux où il se dilue. Chez les Oiseaux et les Reptiles, qui sont uricotéliques, il est transformé en acide urique et chez la plupart des Vertébrés terrestres, qui sont uréotéliques, en urée. Ces deux composés ne sont pas toxiques et peuvent alors être excrétés par le rein. La voie d'élimination de l'ion NH_4^+ est donc largement fonction de l'environnement.

Fumarate
Arginine
H_2O
H_2N O NH_2
Urée
Argininosuccinate
Ornithine
H_2N O
NH_4^+ + CO_3H^- + ATP
R — NH_2
Asparate
Citrulline
Carbamyl phosphate
O — P

Les squelettes carbonés des α-cétoacides rejoignent des voies métaboliques centrales présentées par ailleurs : pyruvate déshydrogénase ou cycle de l'acide citrique ; ils sont utilisés comme molécules énergétiques pour la création de NADH ou de $FADH_2$ ou comme modules biosynthétiques pour la formation de glucose, d'acides gras ou de corps cétoniques. Chez les animaux, la dégradation oxydative des aminoacides se produit essentiellement lorsque ces derniers ne sont pas nécessaires à la synthèse de protéines. Chez l'Homme, elle représente environ 10 % des apports énergétiques, mais elle peut avoir un rôle plus important dans certaines circonstances métaboliques telles que le jeûne ou le diabète sucré. Les carnivores, après un repas, peuvent satisfaire jusqu'à 90 % de leurs besoins en énergie par oxydation des aminoacides. Les végétaux, en revanche, transforment les aminoacides en intermédiaires métaboliques pour enrichir leurs voies biosynthétiques mais utilisent très peu les aminoacides comme source d'énergie.

Dans ce chapitre, nous étudierons successivement l'élimination et le devenir du groupe amine des aminoacides chez les uréotéliques, puis les destinées métaboliques des squelettes carbonés qui en résultent. Enfin, nous présenterons quelques erreurs innées du métabolisme des aminoacides car leur étude a apporté les premières corrélations entre des déficits biochimiques et des états pathologiques.

ORIGINE DES AMINOACIDES

Chez l'Homme, les aminoacides proviennent de la dégradation des protéines dans le tube digestif (*Figure 10.1.A*). L'arrivée de ces dernières dans l'estomac stimule la muqueuse gastrique qui sécrète une hormone, la gastrine ; cette dernière déclenche la sécrétion d'acide chlorhydrique par les cellules pariétales et de pepsinogène par les cellules principales. L'acidité du suc gastrique dénature les protéines qui deviennent alors plus facilement hydrolysables et convertit le pepsinogène en pepsine enzymatiquement active qui hydrolyse les liaisons peptidiques sur le côté N-terminal des résidus aromatiques Phe, Trp et Tyr pour donner un mélange de peptides plus courts.

L'arrivée du contenu acide de l'estomac dans le duodénum provoque par l'intermédiaire d'une hormone, la sécrétine, la sécrétion de bicarbonate par le pancréas et donc une remontée du pH à environ 7. Le duodénum sécrète aussi une autre hormone, la cholécystokinine, qui stimule la sécrétion par les cellules exocrines du pancréas de plusieurs zymogènes, le trypsinogène, le chymotrypsinogène et les procacarboxypeptidases A et B. Le trypsinogène est converti en sa forme active, la trypsine, par l'entéropeptidase sécrétée par les cellules intestinales (*Figure 10.1B*). La trypsine active à son tour les autres zymogènes, y compris le trypsinogène, qui sont alors convertis en trypsine, chymotrypsine et carboxypeptidases, enzymes qui hydrolysent spécifiquement certaines liaisons peptidiques.

Les aminoacides libres résultant des protéines ainsi hydrolysées sont absorbés par les cellules épithéliales qui bordent l'intestin, puis dirigés vers le foie.

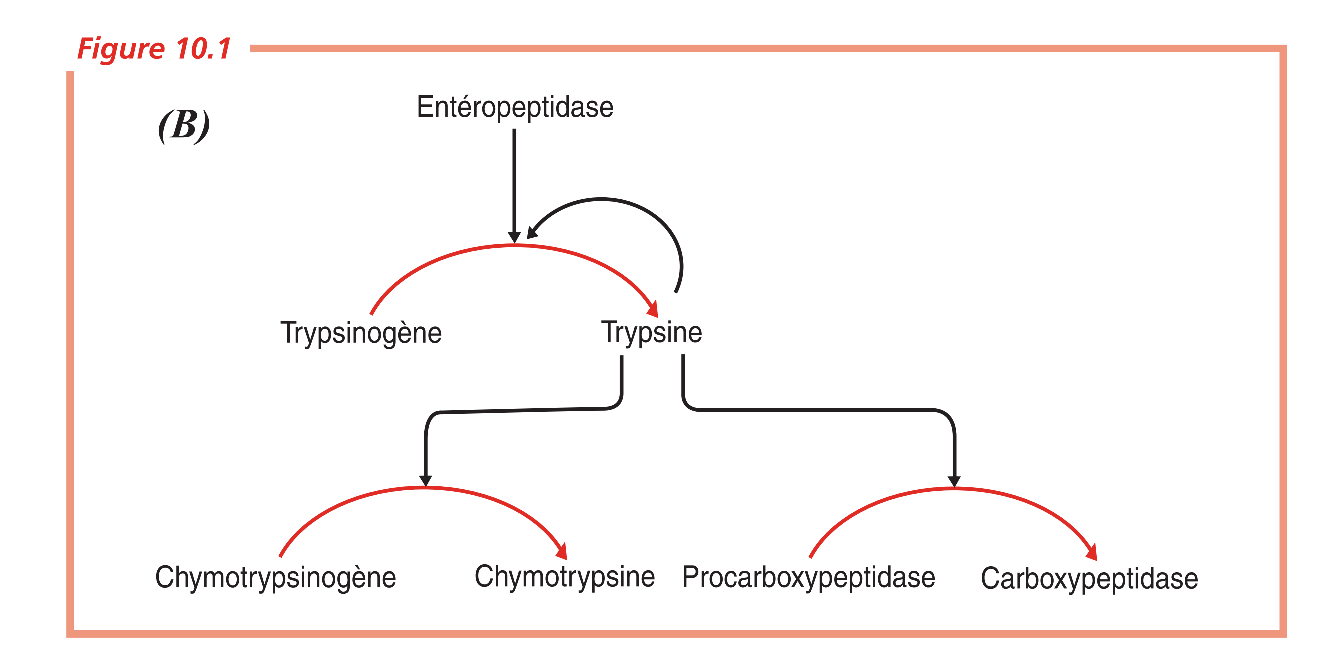
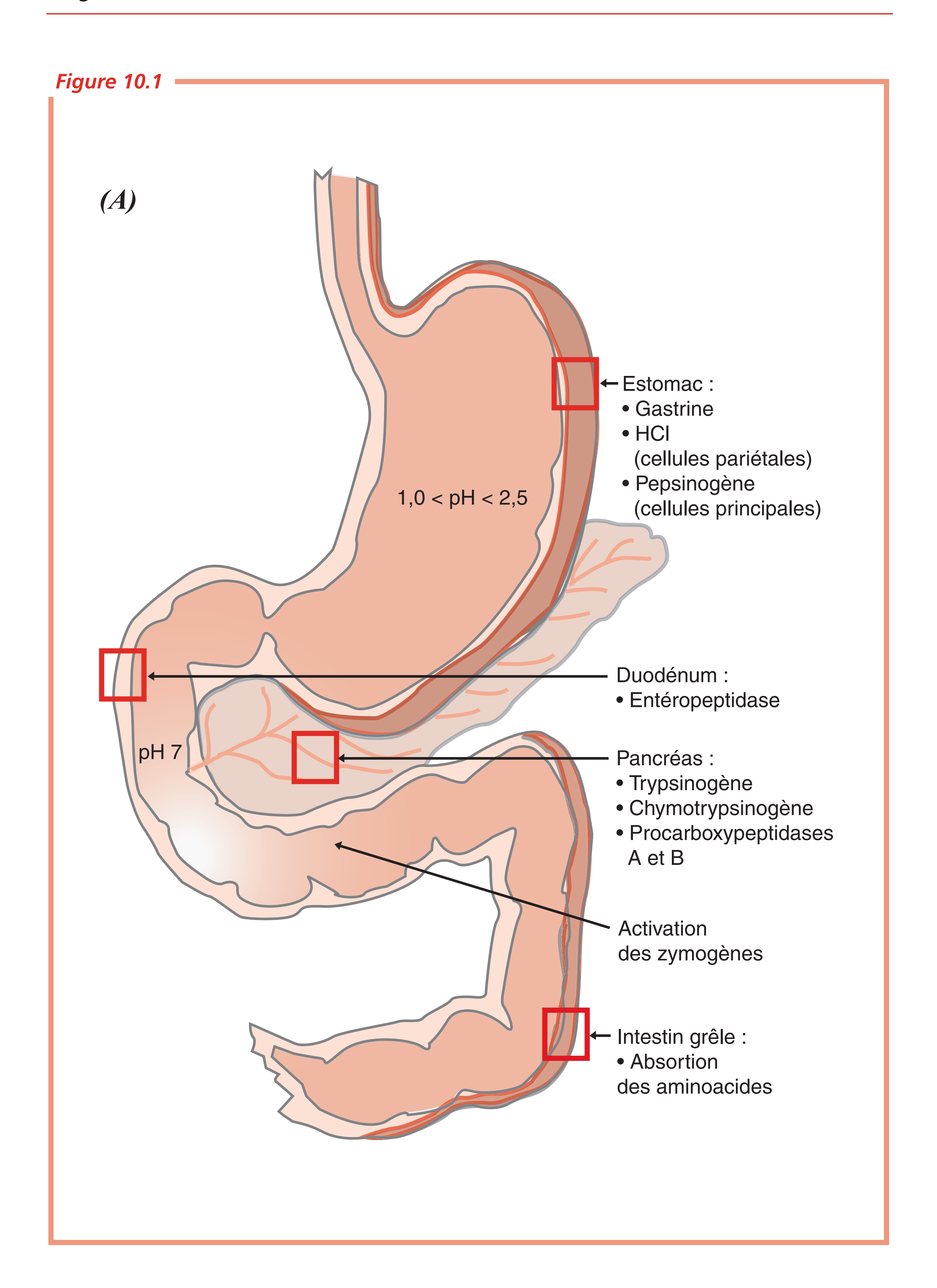


Figure 10.1


(A)
1,0 < pH < 2,5
pH 7
Estomac :
• Gastrine
• HCl
(cellules pariétales)
• Pepsinogène
(cellules principales)
Duodénum :
• Entéropeptidase
Pancréas :
• Trypsinogène
• Chymotrypsinogène
• Procarboxypeptidases
A et B
Activation
des zymogènes
Intestin grêle :
• Absorption
des aminoacides

ÉLIMINATION ET DEVENIR DU GROUPE AMINE DES AMINOACIDES

Vue d'ensemble

Chez les Vertébrés terrestres uréotéliques, la désamination de la plupart des aminoacides dans le cytosol (*Figure 10.2A*) ne donne pas lieu directement à la formation d'un ion ammonium et d'un α-cétoacide car l'ammoniac est toxique pour les cellules. Lors d'une réaction catalysée par une aminotransférase, l'aminoacide est tout d'abord l'objet d'une transamination sur l'α-cétoglutarate avec formation de glutamate et de l'α-cétoacide correspondant à l'aminoacide. Le glutamate pénètre dans la mitochondrie où il subit alors une désamination oxydative catalysée par la glutamate déshydrogénase mitochondriale qui régénère l'α-cétoglutarate et avec formation d'un ion ammonium $NH4^+$. Ce dernier sera converti en urée non toxique grâce à une série de réactions, le cycle de l'urée, initiée dans la matrice mitochondriale et achevée dans le cytosol.

α-Aminoacide → α-Cétoacide ; α-Cétoglutarate → Glutamate ; Glutamate + {NADP$^+$ / NAD$^+$} + H_2O → α-Cétoglutarate + {NADPH / NADH} + NH_4^+ → Urée (H_2N–CO–NH_2)

Transamination des aminoacides

Les aminotransférases (dénommées aussi transaminases), qui catalysent le transfert du groupe α-amine d'un aminoacide à un α-cétoacide (*Figure 10.2B*), sont pour la plupart spécifiques de l'α-cétoglutarate qui est l'accepteur du groupe amine, mais elles diffèrent dans leur spécificité pour l'aminoacide. Ainsi, l'aspartate aminotransférase (ASAT ou GOT, de glutamate-oxaloacétate transaminase) catalyse le transfert du groupe amine de l'aspartate à l'α-cétoglutarate :

$$\text{Aspartate} + \alpha\text{-cétoglutarate} \xrightleftharpoons{\textit{Aspartate aminotransférase}} \text{oxaloacétate} + \text{glutamate}$$

et l'alanine aminotransférase (ALAT ou GPT, de glutamate-pyruvate transaminase) transfert celui de l'alanine à l'α-cétoglutarate également :

$$\text{Alanine} + \alpha\text{–cétoglutarate} \xrightleftharpoons{\textit{Alanine aminotransférase}} \text{pyruvate} + \text{glutamate}$$

La réaction bimoléculaire catalysée par les aminotransférases est de type Ping-Pong (p. 100). Elle est réversible avec une constante d'équilibre d'environ 1,0 et un $\Delta G^{\circ\prime}$ d'approximativement 0 kJ mol^{-1} et peut donc intervenir tout autant dans la désamination que dans la synthèse des aminoacides. Toutes les transaminases ont le pyridoxal phosphate (PLP) comme groupe prosthétique et présentent le même mécanisme de réaction (p. 130).

Figure 10.2

(A)

Biosynthèse des protéines, purines et pyrimidines

Aminoacides
α-Cétoglutarate
Aminotransférases
α-Cétoacides
Glutamate

Glutamine des tissus extrahépatiques
Alanine du muscle

Espace intermembranaire
Matrice mitochondriale externe
Matrice mitochondriale interne

Cytosol
Matrice mitochondriale
Glutamine
Glutaminase
HCO_3^-
2 ATP
2 ADP + P_i
Oxaloacétate
Glutamate
NH_4^+
Carbamyl phosphate
Carbamyl phosphate synthétase I
Aspartate aminotransférase
Glutamate déshydrogénase
Aspartate
α-Céto-glutamate
1
P_i
Ornithine
Ornithine transcarbamylase
Citrulline
Cycle de l'urée
Cytosol
Ornithine
Urée
4
Arginase
H_2O
Arginine
Vers le cycle de l'urée
Citrulline
Argininosuccinate synthétase
2a
ATP
PP_i
Citrullyl AMP
Argininosuccinase
3
Arginino-succinate
Fumarate
2b
AMP
Aspartate

(B)

COO^-
H_3N^+ — C — H
R
α-Aminoacide

Aminotransférase
(PLP)

COO^-
C=O
R
α-Cétoacide

COO^-
C=O
$(CH_2)_2$
COO^-
α-Cétoglutarate

COO^-
H_3N^+ — C — H
$(CH_2)_2$
COO^-
L-Glutamate

Le groupe aldéhyde du PLP forme avec le groupe amine des aminoacides une aldimine (base de Schiff) intermédiaire qui se dissocie en α-cétoacide et pyridoxamine phosphate (PMP) (*Figure 10.3A*). En l'absence de substrat, le PLP est uni au groupe ε-amine d'une lysine de la protéine enzymatique ; en présence de substrat, une nouvelle base de Schiff est formée avec l'aminoacide à désaminer. La forme protonée du PLP agit comme piège à électron qui stabilise les intermédiaires catalytiques chargés négativement ; le PLP se comporte alors en catalyseur électrophile.

La structure tridimensionnelle de l'aspartate aminotransférase mitochondriale a été déterminée (*Figure 10.3B*). C'est un dimère de deux sous-unités identiques de 45 kd formées chacune d'un petit domaine et d'un gros domaine ; ce dernier fixe le PLP dans une poche située près de la surface de l'enzyme au moyen d'une liaison avec la lysine 258 ; le résidu arginine 386 conservé proche du site actif oriente correctement le substrat.
La sérine et la thréonine peuvent être désaminées directement :

$$\text{Sérine} \xrightarrow{\textit{Sérine déshydratase}} \text{pyruvate} + NH_4^+$$

$$\text{Thréonine} \xrightarrow{\textit{Thréonine déshydratase}} \alpha\text{-cétobutyrate} + NH_4^+$$

La dégradation des aminoacides s'effectue dans la plupart des tissus. Dans le muscle, qui ne possède pas les enzymes du cycle de l'urée, les transaminations conduisent au glutamate dont l'azote est transporté par le sang vers le foie sous forme d'alanine :

$$\text{Glutamate} + \text{pyruvate} \xrightarrow{\textit{Alanine aminotransférase}} \alpha\text{-cétoglutarate} + \text{alanine}$$

Dans le cerveau, l'azote est transporté par le sang vers le foie sous forme de glutamine qui est ensuite désaminée :

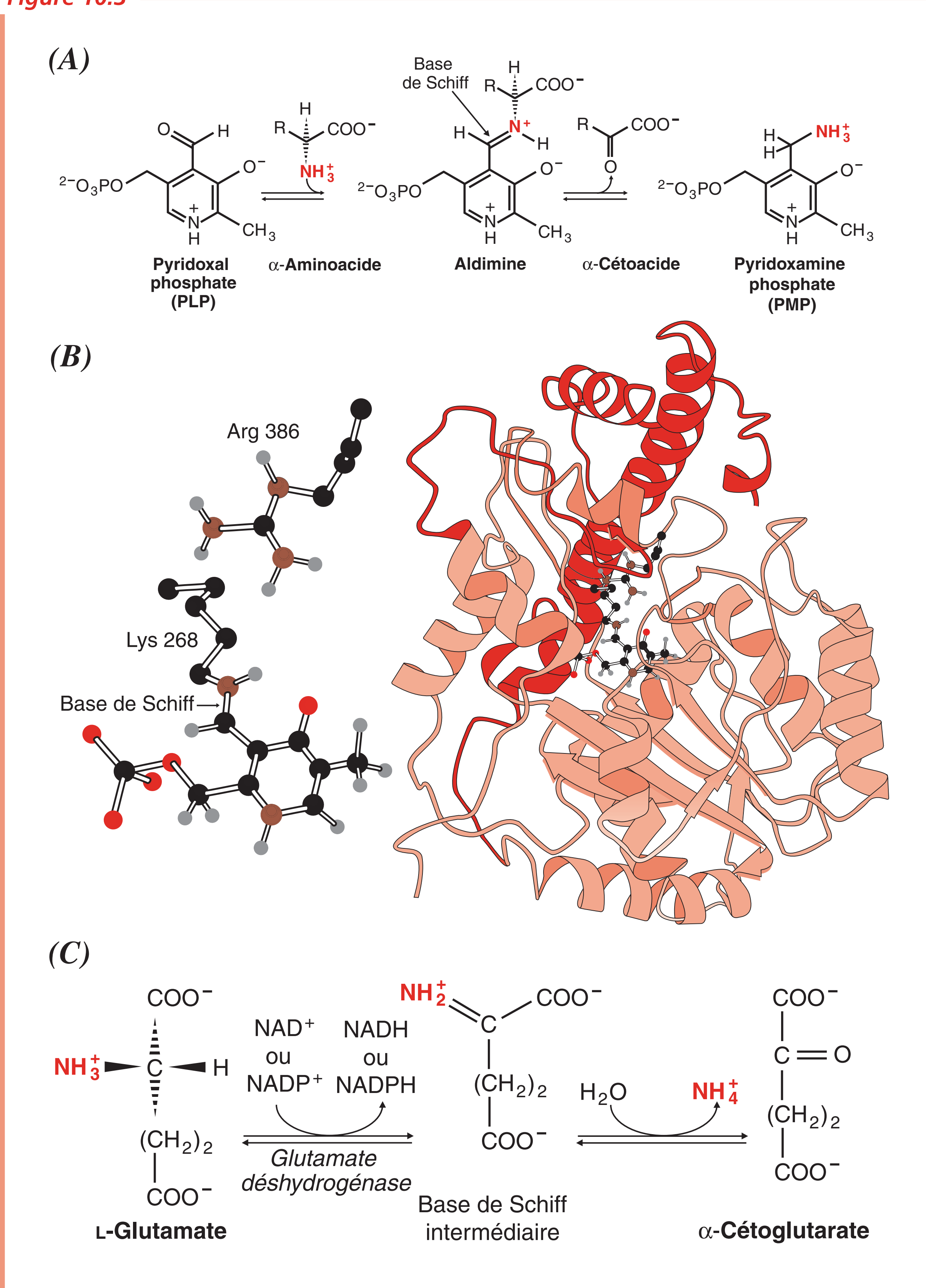
$$NH_4^+ + \text{glutamate} + \text{ATP} \xrightarrow{\textit{Glutamine synthétase}} \text{glutamine} + \text{ADP} + P_i$$

$$\text{Glutamine} \xrightarrow{\textit{Glutaminase mitochondriale}} \text{glutamate} + NH_4^+$$

Désamination oxydative du glutamate

Le glutamate formé lors des réactions de transamination pénètre dans la mitochondrie où l'atome d'azote venant de l'aminoacide est converti par désamination oxydative en ion ammonium NH_4^+ au cours d'une réaction catalysée par la glutamate déshydrogénase mitochondriale (*Figure 10.3C*). Cet enzyme constitué de six sous-unités identiques peut, dans certaines espèces, utiliser le NAD^+ tout autant que le $NADP^+$ comme accepteur d'électrons. Chez les Vertébrés, l'activité de la glutamate déshydrogénase est régulée allostériquement ; le GTP et l'ATP sont inhibiteurs et le GDP et l'ADP activateurs ; une diminution de la charge énergétique active donc la désamination oxydative des aminoacides.

Figure 10.3


(A)
Base de Schiff
Pyridoxal phosphate (PLP)
α-Aminoacide
Aldimine
α-Cétoacide
Pyridoxamine phosphate (PMP)
(B)
Arg 386
Lys 268
Base de Schiff
(C)
NAD+ ou NADP+
NADH ou NADPH
Glutamate déshydrogénase
H2O
NH4+
L-Glutamate
Base de Schiff intermédiaire
α-Cétoglutarate

Uréogenèse

Chez les animaux uréoteliques, une compartimentation séquestre l'ion ammonium NH_4^+ toxique dans les mitochondries hépatiques où il est immédiatement transformé en un composé non toxique, le carbamyl phosphate .Ce dernier entre alors dans le cycle de l'urée (*Figure 10.4*) proposé par Hans Krebs et Kurt Henseleit ; ce cycle est initié dans la mitochondrie, puis il se poursuit dans le cytosol où il se termine avec la formation d'urée qui sera excrétée.

Dans la mitochondrie, NH_4^+ est tout d'abord couplé à HCO_3^- pour former le carbamyl phosphate lors d'une réaction en trois étapes catalysée par la carbamyl phosphate synthétase I mitochondriale. L'hydrolyse des deux molécules d'ATP rend la réaction irréversible. L'isozyme mitochondriale de la carbamyl phosphate synthétase est différent de l'isozyme cytosolique qui initie la biosynthèse des pyrimidines (p. 308). Il est activé allostériquement par le *N*-acétylglutamate synthétisé uniquement lorsque des aminoacides libres sont présents en excès, ce qui indique donc que des ions ammonium devront être éliminés.

Le carbamyl phosphate est un anhydride d'acide et son groupe carbamyle de haut potentiel peut être transféré sur un aminoacide, l'ornithine, avec formation de citrulline lors d'une réaction catalysée par l'ornithine transcarbamylase, enzyme homologue de l'aspartate transcarbamylase qui intervient dans la biosynthèse des pyrimidines (p. 310).

Après transfert de la citrulline dans le cytosol, cette dernière est condensée à l'aspartate, donneur du second groupe amine de l'urée, pour former l'argininosuccinate lors d'une réaction catalysée par l'argininosuccinate synthétase ; la réaction passe par un intermédiaire citrullyl-AMP et l'ATP est hydrolysé en AMP + PP_i qui se scinde immédiatement en deux molécules de P_i, ce qui assure l'irréversibilité. L'argininosuccinate est clivé en arginine et fumarate par l'argininosuccinase, puis l'arginine est hydrolysée par l'arginase pour régénérer l'ornithine et libérer l'urée qui sera excrétée. L'utilisation de l'aspartate comme donneur de groupe amine, puis la libération de fumarate rappellent deux étapes de la biosynthèse des purines et l'argininosuccinate synthétase et l'argininosuccinase sont homologues des enzymes qui assurent ces réactions (p. 312).

La stœchiométrie du cycle de l'urée montre que l'équivalent de quatre molécules d'ATP est consommé pour la formation d'une molécule d'urée et que le cycle de l'urée est connecté à celui de l'acide citrique par le fumarate.

$$CO_2 + HN_4^+ + \mathbf{3\ ATP} + \text{aspartate} + 2\ H_2O \longrightarrow \text{Urée} + 2\ ADP + 2\ P_i + AMP + 2\ PP_i + \text{fumarate}$$

Enfin, on constate que les enzymes du cycle de l'urée ont été adaptés de ceux qui assurent la biosynthèse des bases nucléotidiques.

Figure 10.4

Cycle de l'urée

ATP
ADP
Bicarbonate
Carboxyphosphate
NH_3
Carbamyl phosphate synthétase
P_i
Acide carbamique
ATP
ADP
Carbamyl phosphate
Ornithine transcarbamylase
Ornithine
P_i
Citrulline
ATP
PP_i
Argininosuccinate synthétase
Citrullyl-AMP intermédiaire
AMP
Aspartate
Argininosuccinate
Argininosuccinase
Fumarate
Arginine
H_2O
Arginase
Urée
Ornithine

DESTINÉE MÉTABOLIQUE DES SQUELETTES CARBONÉS DES AMINOACIDES

La dégradation des aminoacides conduit à des intermédiaires métaboliques majeurs. Ces derniers peuvent être complètement oxydés en CO_2 et H_2O par le cycle de l'acide citrique. Ils sont aussi susceptibles d'être convertis en corps cétoniques et en acides gras ou encore en glucose et les aminoacides qui leur ont donné naissance sont alors qualifiés de cétogènes (ou cétoformateurs) ou de glucogènes (ou glucoformateurs), respectivement.

L'ensemble des 20 aminoacides conduit à sept intermédiaires métaboliques : l'acéto-acétyl CoA, l'acétyl CoA, le pyruvate et quatre intermédiaires du cycle de l'acide citrique : l'α-cétoglutarate, le succinyl CoA, le fumarate et l'oxaloacétate (*Figure 10.5*). Six aminoacides : la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine, la tyrosine, la lysine et le tryptophane, sont dégradés en acétoacétyl CoA ou acétyl CoA ; ces derniers peuvent être convertis en corps cétoniques ou en acides gras et les aminoacides qui leur ont donné naissance sont donc cétogènes. À ce propos, on doit rappeler que les Mammifères ont perdu la voie qui conduit à la synthèse du glucose à partir de l'acétyl CoA ou de acétoacétyl CoA. En fait, seules la leucine et la lysine sont purement cétogènes ; la dégradation de la leucine, aminoacide très présent dans la plupart des protéines, contribue largement à la cétose observée dans le jeûne. L'isoleucine, la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine sont à la fois cétogènes et glucogènes car certains de leurs atomes de carbone se retrouvent dans l'acétyl CoA ou l'acétoacétyl CoA tandis que d'autres apparaissent dans des précurseurs du glucose. Les quatorze autres aminoacides sont dégradés en pyruvate, α-cétoglutarate, succinyl CoA, fumarate ou oxaloacétate ; ils sont donc glucogènes étant donné que ces composés peuvent conduire au glucose par l'intermédiaire du phosphoénolpyruvate. Cependant, ceux qui donnent du pyruvate sont également cétogènes car ce dernier peut aussi être métabolisé en acétyl CoA. Ainsi, nombre d'aminoacides sont à la fois cétogènes et glucogènes.

Plusieurs coenzymes jouent un rôle important dans la dégradation des aminoacides. Outre le pyridoxal phosphate dont le rôle dans les réactions de transamination a été étudié précédemment (p. 206), le tétrahydrofolate et la S-adénosylméthionine participent aux réactions enzymatiques qui font intervenir un transfert de groupe monocarboné. La plupart des réactions de dégradation des aminoacides s'effectuent dans le foie.

Chez l'Homme, les voies du catabolisme des aminoacides ne contribuent normalement que pour 10 à 15 % de la production d'énergie nécessaire à l'organisme. Elles sont donc beaucoup moins actives que la glycolyse ou l'oxydation des acides gras.

Figure 10.5

Leucine
Lysine
Phénylalanine
Tryptophane
Tyrosine

Glutamate

Arginine
Glutamine
Histidine
Proline

Isoleucine
Méthionine
Thréonine
Valine

Isocitrate

α-Cétoglutarate

Acétoacétyl-CoA

Citrate

Succinyl-CoA

Acides gras

Glucose

Cycle de l'acide citrique

Acétyl-CoA

Oxaloacétate

Succinate

Fumarate

Aspartate
Phénylalanine
Tyrosine

Malate

Pyruvate

Isoleucine
Leucine
Tryptophane

Alanine
Cystéine
Glycine
Sérine
Tryptophane

Asparagine
Aspartate

LE PYRUVATE COMME POINT D'ENTRÉE DANS LE FLUX MÉTABOLIQUE

Le pyruvate est le point d'entrée dans le flux métabolique des aminoacides à trois carbones, l'alanine, la sérine et la cystéine (*Figure 10.6A*). L'alanine est transaminée directement en pyruvate par l'alanine aminotransférase. La sérine est désaminée en pyruvate par la sérine déshydratase. La cystéine peut être convertie en pyruvate par plusieurs voies, son atome de soufre se retrouvant dans H_2S, SCN^- ou SO_3^{2-}.

La glycine, susceptible d'être clivée en CO_2, NH_4^+ et une unité monocarbonée active, peut aussi rejoindre le métabolisme de la sérine après addition d'un groupe hydroxyméthyle. Deux atomes de carbone du tryptophane se retrouvent dans l'alanine.

Le pyruvate formé à partir de ces aminoacides peut être soit glucogène, soit cétogène selon qu'il est converti en oxaloacétate ou en acétyl CoA.

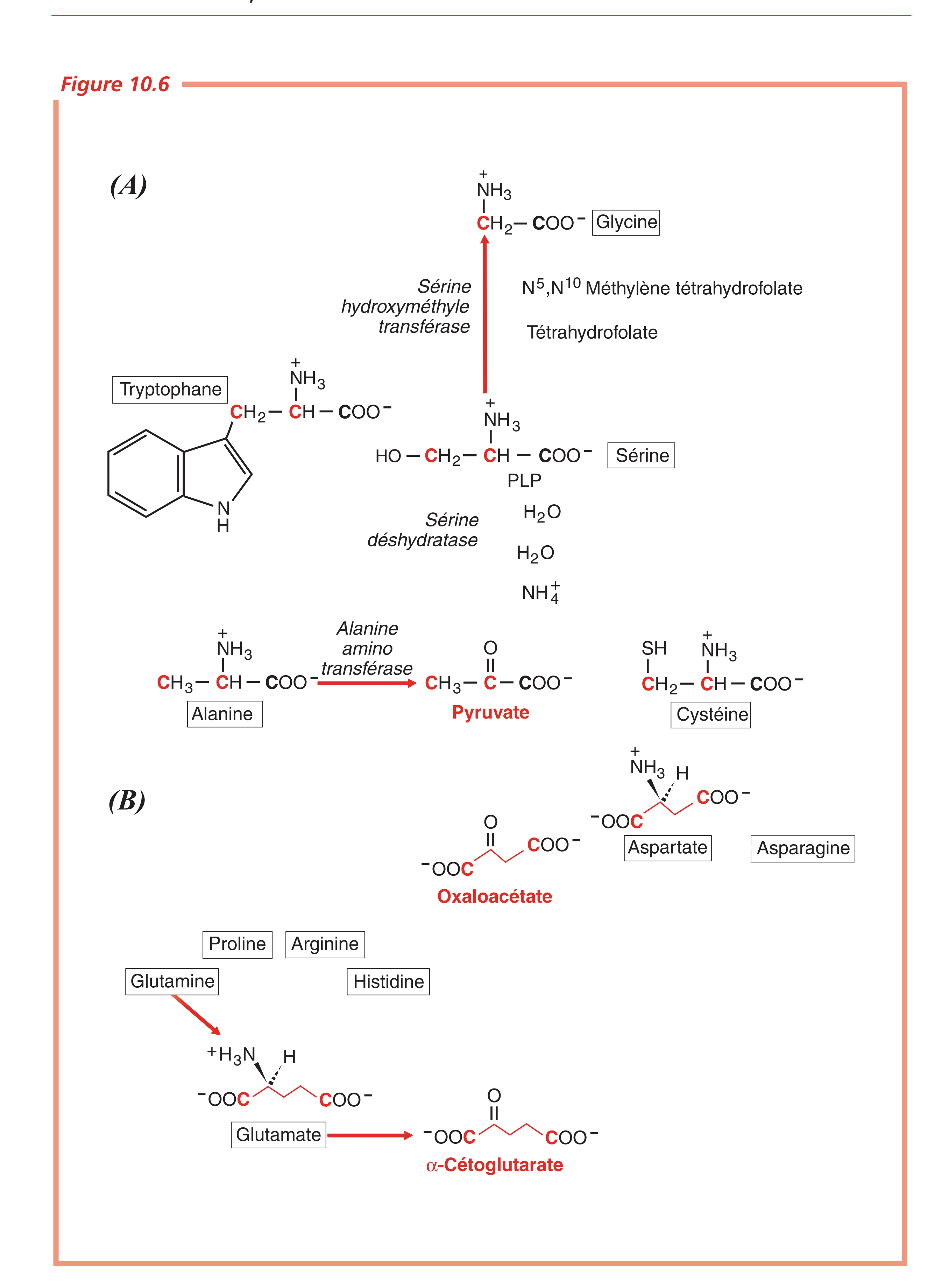
L'OXALOACÉTATE ET L'α-CÉTOGLUTARATE COMME POINT D'ENTRÉE DANS LE FLUX MÉTABOLIQUE

L'aspartate et le glutamate conduisent par transamination réversible à l'oxaloacétate et à l'α-cétoglutarate, respectivement. Le catabolisme de ces aminoacides peut donc s'effectuer par l'entrée du squelette carboné de leurs α-cétoacides correspondants dans le flux métabolique (*Figure 10.6B*). Étant donné que l'oxaloacétate et l'α-cétoglutarate sont des intermédiaires du cycle de l'acide citrique, l'aspartate et le glutamate sont glucogènes. La dégradation de l'asparagine et de la glutamine est initiée par l'hydrolyse de ces derniers en aspartate et en glutamate par l'asparaginase et la glutaminase, respectivement. L'asparagine et la glutamine sont donc elles aussi glucogènes. Dans les cellules en division rapide, telles que les cellules embryonnaires, les cellules en culture ou les cellules cancéreuses, le squelette carboné de la glutamine est une source majeure d'énergie.

Les squelettes carbonés d'aminoacides à cinq carbones tels que la proline, l'arginine et l'histidine conduisent au glutamate. Avant d'être converties en glutamate, l'histidine est transformée en 4-imidazole 5-propionate et la proline et l'arginine en glutamate γ-semialdéhyde.

LE FUMARATE COMME POINT D'ENTRÉE DANS LE FLUX MÉTABOLIQUE

L'aspartate peut aussi être métabolisé en fumarate par le cycle de l'urée (p. 208). Le fumarate est aussi le point d'entrée de la moitié des atomes de carbone de la phénylalanine et de la tyrosine (p. 216).


Figure 10.6
(A)
$\overset{+}{N}H_3$
CH_2-COO^-
Glycine
Sérine
hydroxyméthyle
transférase
N^5,N^{10} Méthylène tétrahydrofolate
Tétrahydrofolate
Tryptophane
$CH_2-CH-COO^-$
N
H
$HO-CH_2-CH-COO^-$
Sérine
PLP
Sérine
déshydratase
H_2O
H_2O
NH_4^+
Alanine
amino
transférase
$CH_3-CH-COO^-$
Alanine
$CH_3-C-COO^-$
Pyruvate
SH
$CH_2-CH-COO^-$
Cystéine
(B)
H
COO^-
^-OOC
Aspartate
Asparagine
O
Oxaloacétate
Proline
Arginine
Glutamine
Histidine
^+H_3N
Glutamate
α-Cétoglutarate

LE SUCCINYL COA COMME POINT D'ENTRÉE DANS LE FLUX MÉTABOLIQUE

Certains atomes de carbone de quatre aminoacides, la méthionine, l'isoleucine, la valine et la thréonine, se retrouvent, après dégradation de ces derniers, dans un intermédiaire du cycle de l'acide citrique, le succinyl CoA (*Figure 10.7*).

La méthionine donne son groupe méthyle à l'un des accepteurs possibles par l'intermédiaire de la S-adénosylméthionine et trois des quatre atomes de carbone restants sont convertis en propionyl CoA, précurseur du succinyl CoA (*Figure 10.8*). L'isoleucine est transaminée puis décarboxylée. Le squelette restant, constitué de cinq atomes de carbone, est oxydé avec formation d'acétyl CoA et de propionyl CoA. La valine est, elle aussi, transaminée et décarboxylée puis une série de réactions transforment les quatre atomes de carbone restants en propionyl CoA. Certaines réactions de la dégradation de la valine et de l'isoleucine rappellent celles des acides gras.

Figure 10.8

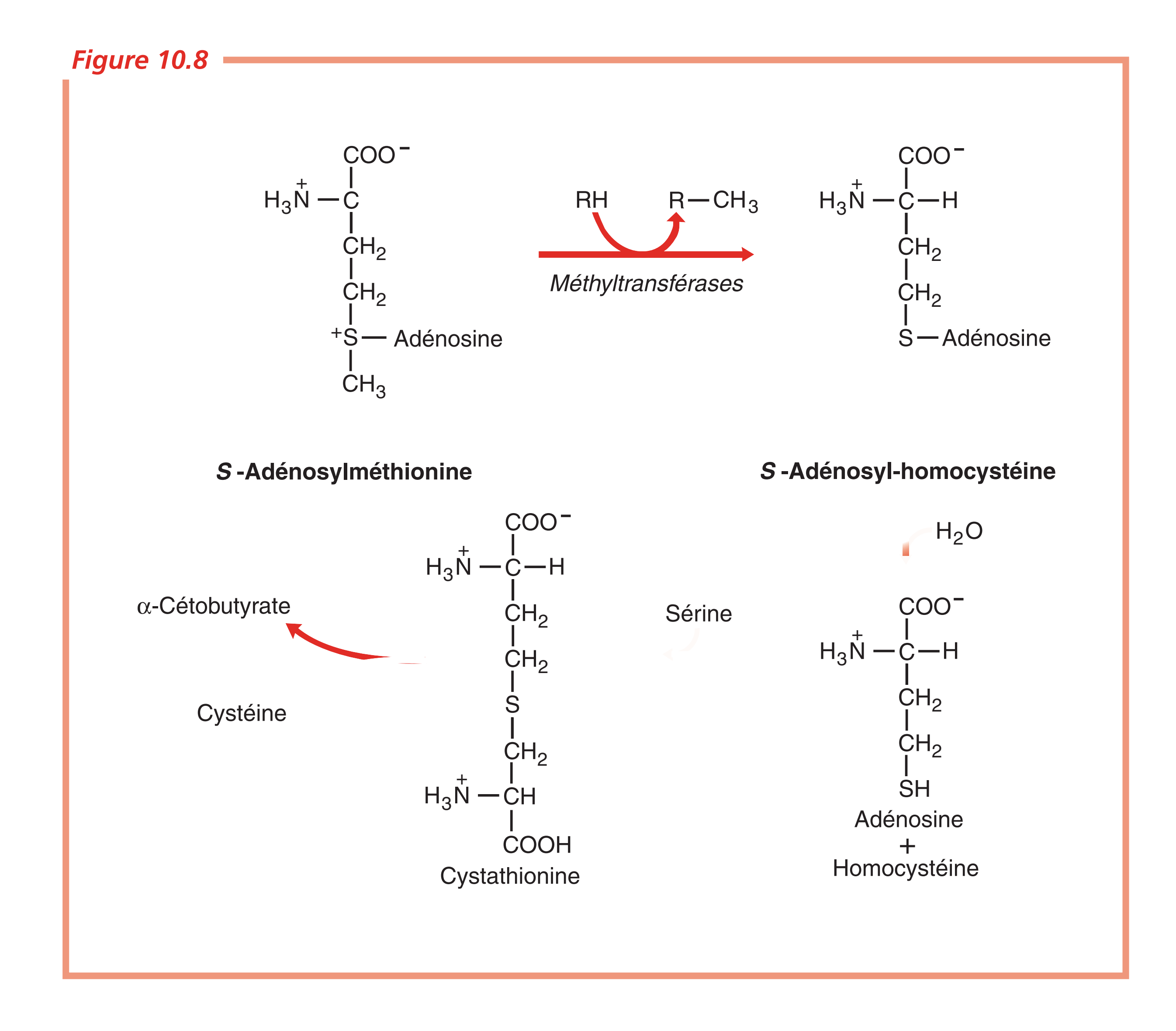




Figure 10.7

$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$
Méthionine
$CH_3-CH(OH)-CH(NH_3^+)-COO^-$
Thréonine
Thréonine déshydratase
PLP
NH_4^+
H_2O
$CH_3-CH_2-C(=O)-COO^-$
α-Cétobutyrate
CoA-SH
α-Cétoacide déshydrogénase
NAD^+
$NADH + H^+$
CO_2
$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH(NH_3^+)-COO^-$
Isoleucine
CO_2
$CH_3-CH_2-C(=O)-S\text{-}CoA$
Propionyl-CoA
CO_2
$CH_3-CH(CH_3)-CH(NH_3^+)-COO^-$
Valine
$CH_3-C(=O)-S\text{-}CoA$
Acétyl-CoA
HOC_3^-
$^-OOC-CH(CH_3)-C(=O)-S\text{-}CoA$
Méthylmalonyl-CoA
Méthylmalonyl-CoA mutase
$^-OOC-CH_2-CH_2-C(=O)-S\text{-}CoA$
Succinyl-CoA

LA DÉGRADATION DES AMINOACIDES AROMATIQUES FAIT INTERVENIR DES OXYGÉNASES

Le catabolisme des trois aminoacides aromatiques, phénylalanine, tyrosine et tryptophane, fait intervenir des mécanismes semblables : une oxydation dans les premières étapes de la voie, l'élimination de l'azote par transamination ou hydrolyse, puis l'ouverture du cycle aromatique couplée à une oxydation.

Le métabolisme de la phénylalanine (*Figure 10.9A*) commence par son hydroxylation en tyrosine. Cette réaction complexe, où intervient l'oxygène moléculaire O_2, et un réducteur, la tétrahydrobioptérine, est catalysée par une mono-oxygénase, la phénylalanine hydroxylase (*Figure 10.10*) ; elle permet la biosynthèse de la tyrosine mais elle est aussi la première étape de la dégradation de la phénylalanine. L'étape suivante est la transamination de la tyrosine en *p*-hydroxyphényl pyruvate. Cet α-cétoacide réagit ensuite avec O_2 dans une réaction complexe catalysée par une dioxygénase, la *p*-hydroxyphénylpyruvate hydroxylase, pour former l'homogentisate. Le cycle aromatique de ce dernier est ensuite clivé par une deuxième dioxygénase, l'homogentisate oxydase ; le 4-maléylacétoacétate qui en résulte est isomérisé en 4-fumaryl acétoacétate qui s'hydrolyse en fumarate et acétoacétate.

La dégradation du tryptophane (*Figure 10.9B*) fait intervenir elle aussi plusieurs oxygénases. La tryptophane 2,3-dioxygénase clive le cycle pyrrole et la cynurénine 3-mono-oxygénase hydroxyle le cycle benzène restant. L'alanine est éliminée et une troisième dioxygénase clive l'acide 3-hydroxyanthranilique restant avec formation d'acétoacétyl CoA.

Figure 10.10

Phénylalanine

Tyrosine

O_2 → H_2O

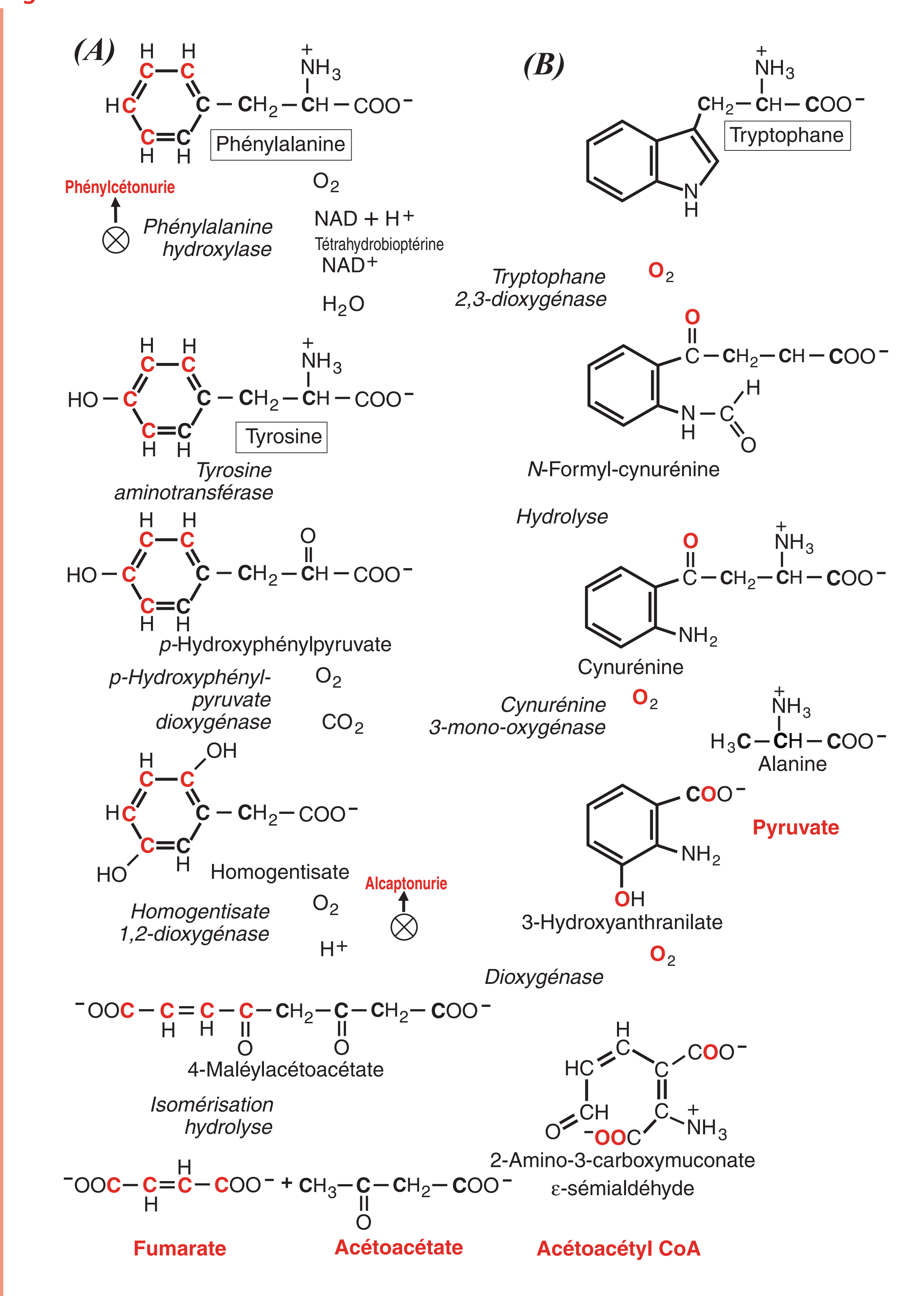
Phénylalanine hydroxylase

5,6,7,8, Tétrahydrobioptérine

7,8, Dihydrobioptérine

NAD^+ ← $NADH + H^+$

Figure 10.9


(A)
Phénylalanine
Phénylcétonurie
Phénylalanine hydroxylase
O_2
NAD + H+
Tétrahydrobioptérine
NAD+
H_2O
Tyrosine
Tyrosine aminotransférase
p-Hydroxyphénylpyruvate
p-Hydroxyphényl-pyruvate dioxygénase
O_2
CO_2
Homogentisate
Alcaptonurie
Homogentisate 1,2-dioxygénase
O_2
H+
4-Maléylacétoacétate
Isomérisation hydrolyse
Fumarate
Acétoacétate
(B)
Tryptophane
Tryptophane 2,3-dioxygénase
O_2
N-Formyl-cynurénine
Hydrolyse
Cynurénine
Cynurénine 3-mono-oxygénase
O_2
Alanine
Pyruvate
3-Hydroxyanthranilate
O_2
Dioxygénase
2-Amino-3-carboxymuconate ε-sémialdéhyde
Acétoacétyl CoA

LES AMINOACIDES À CHAÎNE RAMIFIÉE, LEUCINE, VALINE ET ISOLEUCINE, SONT DÉGRADÉS PAR DES VOIES QUI ONT DES ÉTAPES COMMUNES

La leucine, la valine et l'isoleucine sont dégradées par des voies dont les trois premières étapes sont effectuées grâce à des enzymes communs (*Figure 10.11*). La réaction de transamination initiale, catalysée par la transaminase des aminoacides à chaîne ramifiée, s'effectue essentiellement dans le muscle. Les étapes suivantes ont lieu dans le foie. L'α-cétoacide résultant est tout d'abord l'objet d'une décarboxylation oxydative analogue à celle du pyruvate en acétyl CoA et de l'α-cétoglutarate en succinyl CoA ; cette réaction conduit à un acyl CoA dont la chaîne a un carbone de moins que celle de α-cétoacide de départ. Le complexe de la déshydrogénase des α-cétoacides à chaîne ramifiée est homologue de ceux de la pyruvate déshydrogénase et de l'α-cétoglutarate déshydrogénase ; en particulier, les composants E_3 de ces enzymes qui régénèrent la forme oxydée du lipoamide sont identiques. Ce complexe est inhibé par les acyl CoA à chaîne ramifiée ainsi que par la phosphorylation de l'une de ses sous-unités, ce qui permet le contrôle de la dégradation de l'ensemble des aminoacides à chaîne ramifiée. Par la suite, les acyl CoA sont oxydés par une acyl-CoA déshydrogénase à FAD ; les électrons sont transférés sur l'ubiquinone. Ainsi, les enzymes des étapes initiales de la dégradation des aminoacides à chaîne ramifiée sont homologues de ceux mis en œuvre dans le cycle de l'acide citrique et dans l'oxydation des acides gras.

Par la suite, les voies divergent et de nombreuses étapes conduisent les α,β-déhydroacyl CoA formés vers des intermédiaires métaboliques centraux tels que l'acétoacétate, l'acétyl CoA, le propionyl CoA et le succinyl CoA.

ERREURS INNÉES DU MÉTABOLISME DES AMINOACIDES

Un défaut génétique peut affecter un enzyme de la voie de dégradation de certains aminoacides. Il en résulte une accumulation d'intermédiaires toxiques qui provoquent un grave retard physique et psychique conduisant à une mort précoce, à moins que le malade ne soit mis à un régime pauvre en aminoacide non métabolisable.

La première maladie génétique due à un catabolisme anormal d'un aminoacide à avoir été reconnue, et la seule qui soit relativement bénigne, est l'alcaptonurie. Elle est la conséquence de l'absence d'homogentisate oxydase. L'homogentisate est alors excrété dans l'urine où il se polymérise en substances voisines des mélanines qui donnent la couleur noire caractéristique de l'urine des alcaptonuriques. La phénylcétonurie, la plus fréquente (1 sur 20 nouveau-nés) et la mieux connue des maladies du métabolisme des aminoacides, est due à un déficit en phénylalanine hydroxylase. Le dépistage est systématique dans le sang du cordon et le traitement consiste en une alimentation pauvre en phénylalanine. Dans la maladie des urines à odeur de sirop d'érable, la décarboxylation oxydative des α-cétoacides dérivés des aminoacides à chaîne ramifiée, la leucine, la valine et l'isoleucine, la déshydrogénase des α-cétoacides à chaîne ramifiée est manquante ou défectueuse.



H_3C–$CH(CH_3)$–CH_2–$CH(^+NH_3)$–COO^- **Leucine**

H_3C–$CH(CH_3)$–$CH(^+NH_3)$–COO^- **Valine**

H_3C–H_2C–$CH(CH_3)$–$CH(^+NH_3)$–COO^- **Isoleucine**

Transamination — *Transaminase des aminoacides à chaîne ramifiée* — α-Cétoglutarate → Glutamate

α-Cétoacide R–C(=O)–COO^-

Décarboxylation oxydative — *Déhydrogénase des α-cétoacides à chaîne ramifiée* — NAD^+, HS-CoA → NADH CO_2

⊗ **Maladie des urines à odeur de sirop d'érable**

Acyl CoA R–C(=O)–S-CoA

Déshydrogénation — *Acyl-CoA déshydrogénase* — ETF : FAD → ETF : $FADH_2$; QH_2 / Q

α,β Déhydroacyl CoA

H_3C–C(CH_3)=CH–C(=O)–S-CoA

H_2C=C(CH_3)–C(=O)–S-CoA

H_3C–CH=C(CH_3)–C(=O)–S-CoA

^-OOC–CH_2–C(=O)–CH_3 **Acétoacétate**

H_3C–C(=O)–S-CoA **Acétyl CoA**

H_3C–C(=O)–S-CoA **Acétyl CoA**

H_3C–CH_2–C(=O)–S-CoA Propionyl CoA

^-OOC–CH_2–CH_2–C(=O)–S-CoA **Succinyl CoA**

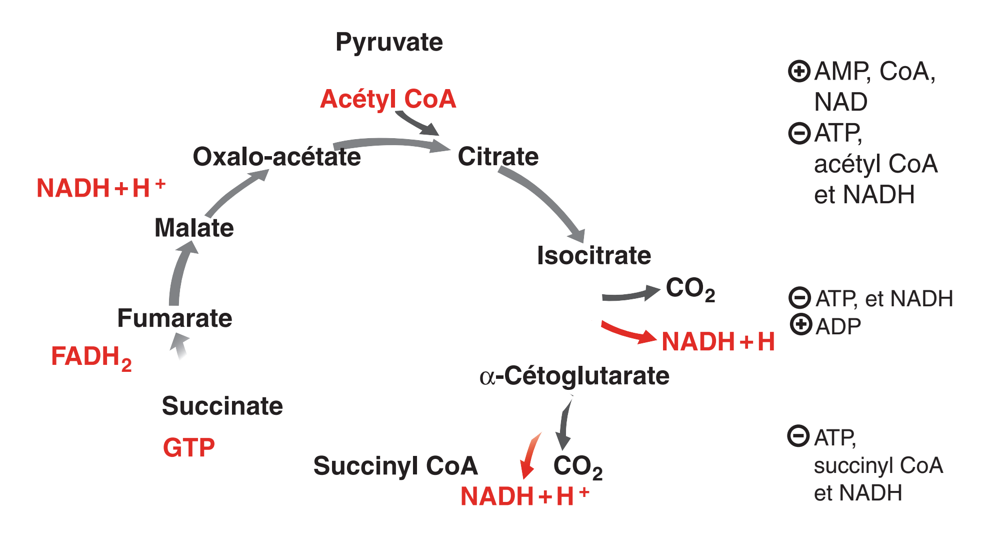
Chapitre 11

Cycle de l'acide citrique

Le cycle de l'acide citrique, ou encore cycle de Krebs, est la voie métabolique terminale commune d'oxydation des glucides, des acides gras et des aminoacides. Comme il a été exposé dans les chapitres 8, 9 et 10, les voies initiales spécifiques d'oxydation de ces molécules, en l'occurrence la glycolyse anaérobie, la β-oxydation des acides gras et la désamination oxydative des aminoacides suivie de la dégradation des α-cétoacides correspondants, conduisent à un nombre limité de composés : pyruvate, acétoacétate, acétyl CoA ou acides dicarboxyliques tels que l'α-cétoglutarate, le succinyl CoA, le fumarate et l'oxaloacétate. L'entrée de ces derniers dans une suite de réactions d'oxydation-réduction, connue sous le nom de cycle de l'acide citrique, les conduit à y être oxydés en dioxyde de carbone (CO_2) avec transfert de certains de leurs électrons de haute énergie au nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) ou au flavine adénine dinucléotide (FAD) qui sont alors réduits en NADH + H^+ ou $FADH_2$, respectivement.

Afin de répondre de façon précise aux besoins énergétiques de la cellule, la vitesse du cycle de l'acide citrique doit être contrôlée et certaines réactions clé du cycle de l'acide citrique sont précisément régulées.

L'entrée dans le cycle de l'acide citrique du pyruvate issu du catabolisme du glucose ou de certains aminoacides nécessite sa décarboxylation oxydative préalable en acétyl CoA qui est, elle aussi, étroitement régulée.



Ainsi, dans le long et complexe processus d'extraction de l'énergie des molécules, la fonction du cycle de l'acide citrique est donc de transférer des électrons de haute énergie venant des glucides, des lipides et des aminoacides à des dinucléotides qui seront oxydés dans la chaîne respiratoire.

FORMATION DE L'ACÉTYL COA À PARTIR DU PYRUVATE : LE COMPLEXE PYRUVATE DÉSHYDROGÉNASE

Chez les Procaryotes et les Eucaryotes, la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl CoA et CO_2 est une opération beaucoup plus complexe que ne le laisse supposer la simple réaction :

$$CH_3\text{–CO–COO}^- + \text{CoA} \rightarrow CH_3\text{–CO–S–CoA} + CO_2$$

En fait, elle est assumée par un très gros complexe, le complexe pyruvate déshydrogénase (*Figure 11.1*), qui associe trois types d'enzymes : la pyruvate déshydrogénase (E_1), la dihydrolipoyl transacétylase (E_2) et la dihydrolipoyl déshydrogénase (E_3), deux coenzymes stœchiométriques : le coenzyme A (CoA) et le NAD^+, ainsi que trois coenzymes catalytiques : le thiamine pyrophosphate (TPP), le lipoamide et le FAD. Le complexe pyruvate déshydrogénase est membre d'une famille de complexes homologues qui inclut, entre autres, l'α-cétoglutarate déshydrogénase du cycle de l'acide citrique (p. 229) et la déshydrogénase des α-cétoacides à chaîne ramifiée (p. 218).

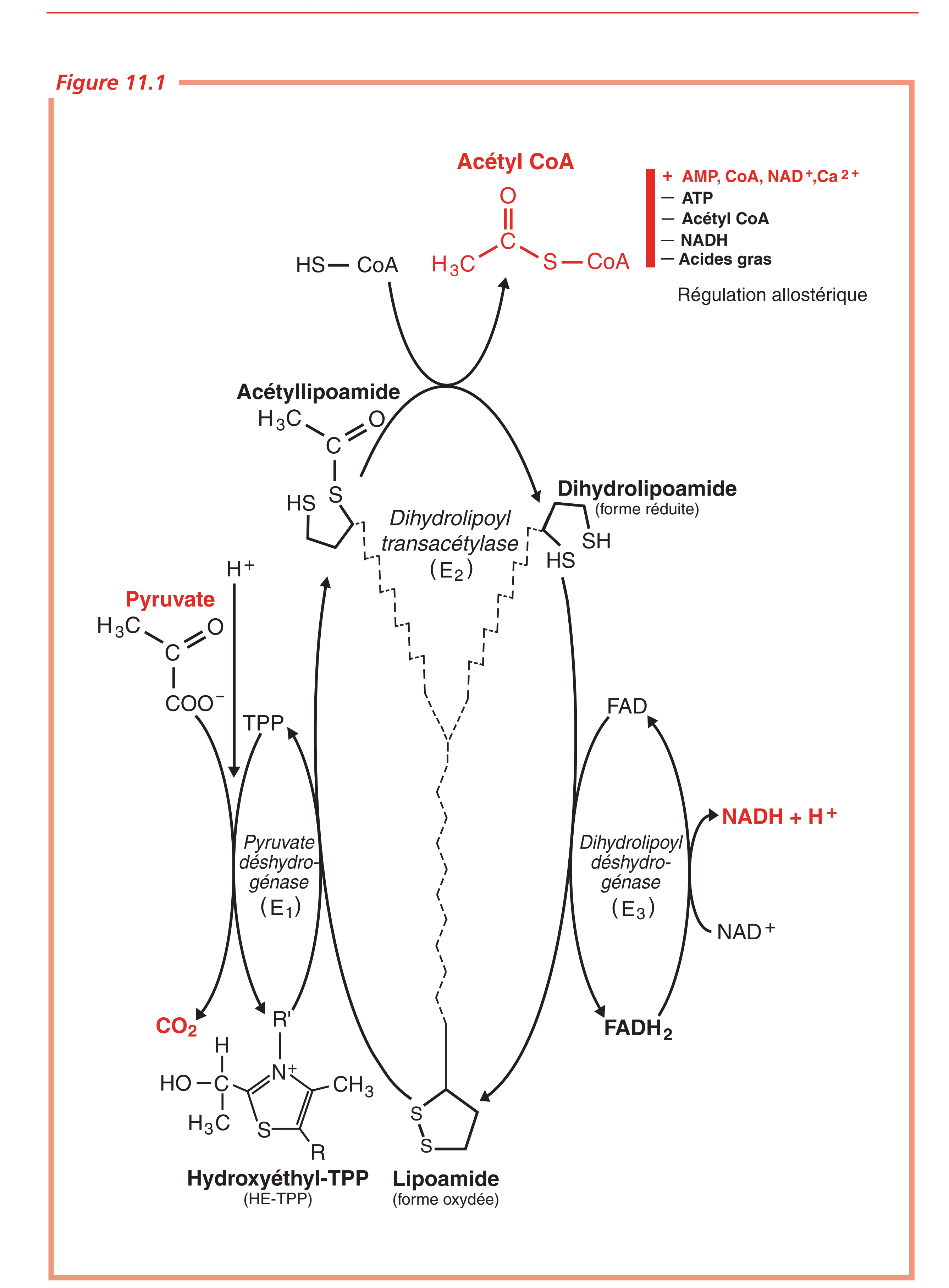
Le core du complexe est formé par E_2 constituée de huit trimères catalytiques dont les extrémités N-terminales présentent un bras formé par un résidu lysine lié au le cofacteur lipoamide. Vingt-quatre copies de E_1, qui est un tétramère $\alpha_2\beta_2$, et douze copies de E_3, qui est un dimère αβ, entourent le core E_2.

La pyruvate déshydrogénase E_1 catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate qui réagit avec son coenzyme, le TPP ; il en résulte la formation de CO_2 et d'hydroxyéthylthiamine pyrophosphate (HE-TPP) qui réagit directement avec le groupe prosthétique lipoamide de la dihydrolipoyl transacétylase E_2. Ce dernier, constitué d'un acide lipoïque uni à un résidu lysine de l'enzyme par une liaison amide, se présente alors sous sa forme disulfure capable d'oxyder et de fixer le fragment dicarboné de HE-TPP sous forme d'acétyllipoamide, puis de transférer le groupe acétyle ainsi formé au CoA réduit ; il en résulte la création d'un acétyl CoA et d'un groupe lipoamide sous forme dihydrogénée. Ce dernier réagit directement avec le groupe prosthétique FAD de la dihydrolipoyl déshydrogénase E_3 qui est alors réduit en $FADH_2$ tandis que le groupe lipoamide réapparaît sous sa forme disulfure. Enfin, E_3-$FADH_2$ réduit NAD^+ en NADH.

L'intégration structurale des trois types d'enzyme au sein d'un complexe rend possible la catalyse coordonnée de la conversion du pyruvate en acétyl CoA. Le produit d'une réaction n'y diffuse pas ; il est immédiatement repris par l'enzyme suivant du complexe, la canalisation des métabolites étant assurée par la liaison de ces derniers au groupe prosthétique lipoamide flexible de la dihydrolipoyl transacétylase E_2.

Chez les animaux, la décarboxylation du pyruvate en acétyl CoA est une réaction irréversible qui engage les carbones du glucose et de certains aminoacides dans une oxydation en CO_2 par le cycle de l'acide citrique ou dans une incorporation dans les lipides. Elle doit donc être strictement contrôlée par les produits de la réaction ; ainsi, E_2 est inhibée par l'acétyl CoA et E_3 par le NADH. Cependant, le moyen de régulation essentielle est l'inhibition de l'activité du complexe après phosphorylation réversible par une kinase spécifique.

Figure 11.1


Acétyl CoA
O
C
HS — CoA
H3C
S — CoA
+ AMP, CoA, NAD+,Ca2+
— ATP
— Acétyl CoA
— NADH
— Acides gras
Régulation allostérique
Acétyllipoamide
H3C
C
O
S
HS
Dihydrolipoyl
transacétylase
(E2)
Dihydrolipoamide
(forme réduite)
SH
HS
H+
Pyruvate
H3C
C
O
COO−
TPP
FAD
NADH + H+
Pyruvate
déshydro-
génase
(E1)
Dihydrolipoyl
déshydro-
génase
(E3)
NAD+
CO2
R'
FADH2
H
HO — C
N+
CH3
H3C
S
R
S
S
Hydroxyéthyl-TPP
(HE-TPP)
Lipoamide
(forme oxydée)

OXYDATION DE L’ACÉTYL COA PAR LE CYCLE DE L’ACIDE CITRIQUE : VUE D’ENSEMBLE

L’oxydation de l’acétyl CoA résultant du catabolisme des glucides, des acides gras et des aminoacides est effectuée par une voie métabolique cyclique comportant huit étapes, connue sous le nom de cycle de l’acide citrique (*Figure 11.2*). Le cycle commence par la condensation de l’acétyl CoA à oxyder (dont les carbones sont représentés en rouge dans la figure 11.2) avec l’oxaloacétate, composé à 4 carbones (dont le carbone du carboxyle le plus éloigné du carbonyle est représenté en gras dans la figure 11.2), pour former tout d’abord le citrate, composé à 6 carbones, qui est ensuite isomérisé en isocitrate. L’isocitrate est déshydrogéné avec perte de CO_2, ce qui conduit à la formation d’α-cétoglutarate et d’une première molécule de NADH. L’α-cétoglutarate subit lui aussi une déshydrogénation avec perte de CO_2 et formation de succinyl CoA et d’une deuxième molécule de NADH. Trois réactions enzymatiques successives convertissent le succinyl CoA en oxaloacétate qui est prêt pour la condensation avec une nouvelle molécule d’acétyl CoA ; au cours de cette dernière phase du cycle de l’acide citrique une molécule de GTP, une molécule de $FADH_2$ et une troisième molécule de NADH sont créées.

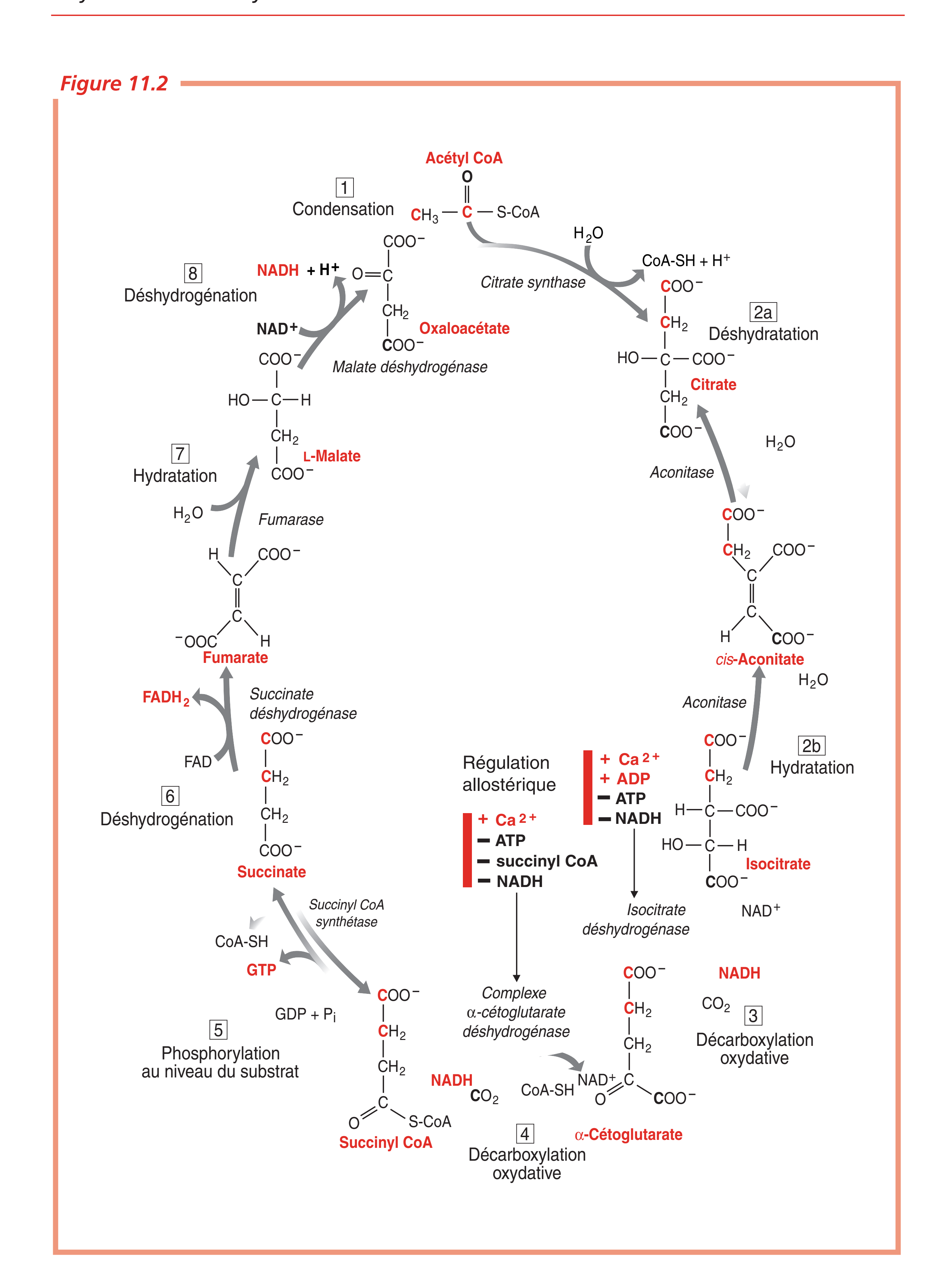
Le carbone du CO_2 résultant de la décarboxylation de l’α-cétoglutarate provient en totalité du carbone du carboxyle le plus éloigné du carbonyle de l’oxaloacétate.

L’activité du cycle de l’acide citrique est contrôlée essentiellement par l’isocitrate déshydrogénase et l’α-cétoglutarate déshydrogénase qui sont des enzymes allostériques (p. 31).

Le cycle de l’acide citrique en lui-même ne fait pas intervenir l’oxygène en tant que réactif et ne crée pas d’ATP, mais quatre de ses huit étapes sont des oxydations dont l’énergie est stockée sous forme de NADH et de $FADH_2$, ce qui confère au cycle de l’acide citrique un rôle central dans la production de l’énergie cellulaire. À chaque tour du cycle, une molécule d’oxaloacétate est reformée, ce qui explique qu’en dépit de la très faible concentration de l’oxaloacétate dans la cellule, le cycle de l’acide citrique soit très efficace. De plus, des intermédiaires du cycle à quatre ou cinq carbones sont des précurseurs de nombre de molécules d’intérêt biologique.

Chez les Procaryotes, les enzymes du cycle de l’acide citrique sont dans le cytosol mais chez les Eucaryotes le cycle s’effectue en totalité au sein des mitochondries qui contiennent tous les enzymes et coenzymes nécessaires à son déroulement ainsi que la chaîne de transport des électrons et l’ATP syntaxe qui constituent les structures où ont lieu les dernières étapes de la production d’ATP. Chez les Eucaryotes photosynthétiques, dans la lumière du jour, les sites principaux de production d’ATP sont les chloroplastes, mais à l’obscurité ce sont les mitochondries. Dans les cellules aérobies non photosynthétiques, le cycle de l’acide citrique, de concert avec la phosphorylation oxydative, apporte la plus grande partie de l’énergie, soit plus de 95 % chez l’Homme.

Figure 11.2



Acétyl CoA
1 Condensation
Citrate synthase
CoA-SH + H+
2a Déshydratation
Citrate
Aconitase
cis-Aconitate
Aconitase
2b Hydratation
Isocitrate
Isocitrate déshydrogénase
NAD+
NADH
CO2
3 Décarboxylation oxydative
α-Cétoglutarate
Complexe α-cétoglutarate déshydrogénase
CoA-SH
NADH
CO2
4 Décarboxylation oxydative
Succinyl CoA
Succinyl CoA synthétase
GDP + Pi
GTP
CoA-SH
5 Phosphorylation au niveau du substrat
Succinate
Succinate déshydrogénase
FADH2
FAD
6 Déshydrogénation
Fumarate
Fumarase
H2O
7 Hydratation
L-Malate
Malate déshydrogénase
NAD+
NADH + H+
8 Déshydrogénation
Oxaloacétate
Régulation allostérique
+ Ca2+
+ ADP
– ATP
– NADH
+ Ca2+
– ATP
– succinyl CoA
– NADH

RÉACTIONS DU CYCLE DE L'ACIDE CITRIQUE

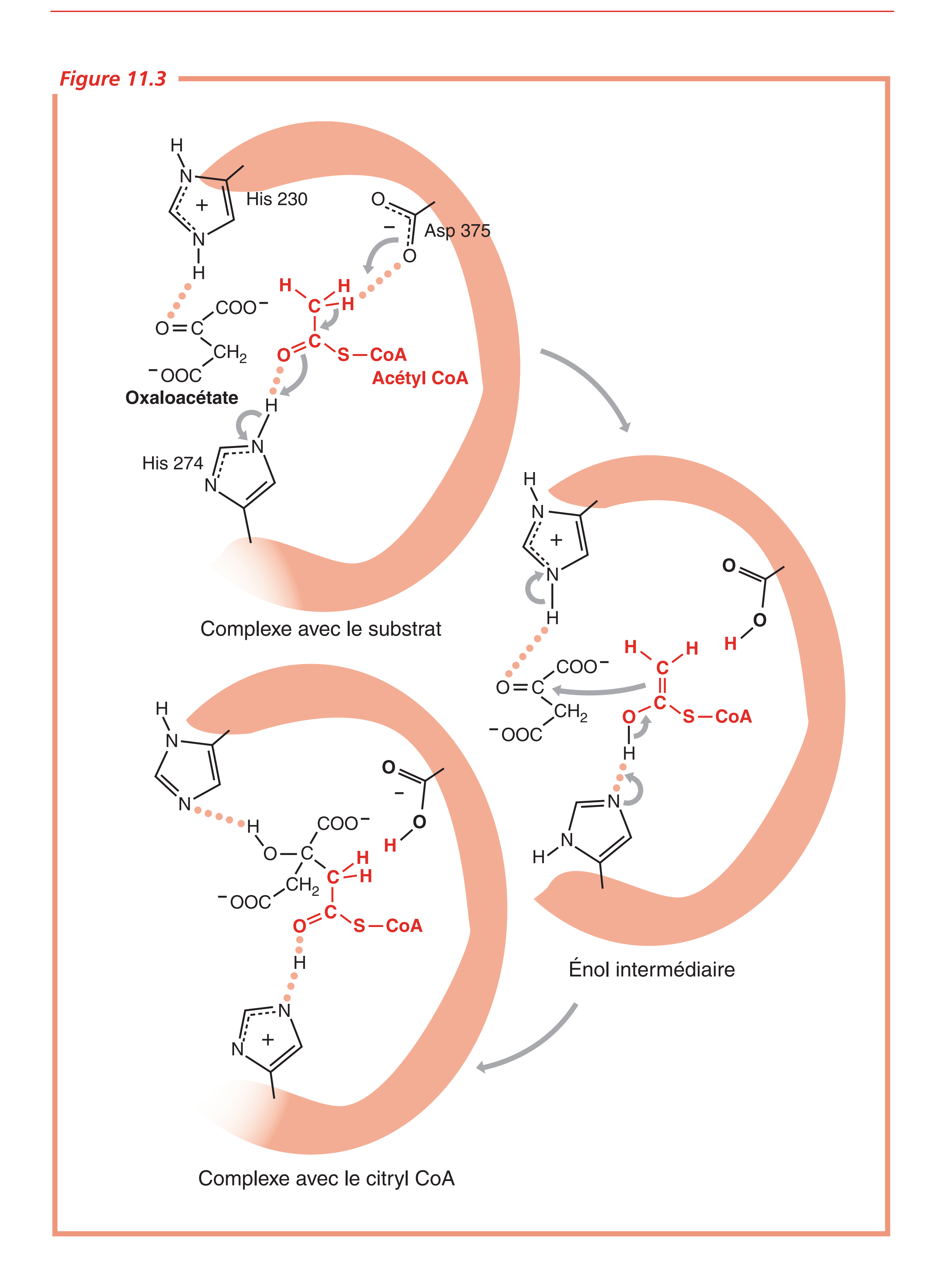
1. Formation du citrate à partir de l'acétyl CoA et de l'oxaloacétate

La citrate synthase initie le cycle de l'acide citrique en condensant l'oxaloacétate à l'acétyl CoA pour former le citryl CoA, thioester intermédiaire de haute énergie dont l'hydrolyse subséquente déplace l'équilibre dans le sens de la synthèse. La citrate synthase est un dimère de deux sous-unités identiques de 49 kDa. La réaction est de type séquentiel ordonné. L'oxaloacétate se fixe en premier et induit un important réarrangement structural qui conduit à la création d'un site de liaison pour l'acétyl CoA. À la suite de cette première adaptation induite, le citryl CoA se forme à la surface de l'enzyme ; deux résidus histine et un résidu aspartate orientent et polarisent certaines liaisons et la formation du citryl CoA passe par un énol intermédiaire (*Figure 11.3*). Une fois formé, le citryl CoA induit de nouveaux changements structuraux de l'enzyme qui conduisent à l'hydrolyse du thioester avec libération du CoA et du citrate. Cette deuxième adaptation induite assure l'efficacité de la citrate synthase en rendant cette dernière capable d'hydrolyser le citryl CoA mais pas l'acétyl CoA, ce qui évite tout gaspillage. Ce mécanisme rappelle celui de l'hexokinase (p. 108 et 164) et de la triose phosphate isomérase (p. 168).

Oxaloacétate + Acétyl CoA → (*Citrate synthase*) → Citryl CoA → (H_2O, CoA) → Citrate

Oxaloacétate **Acétyl CoA** **Citryl CoA** **Citrate**

Figure 11.3


His 230
Asp 375
COO⁻
CH2
⁻OOC
Oxaloacétate
S—CoA
Acétyl CoA
His 274
Complexe avec le substrat
Énol intermédiaire
Complexe avec le citryl CoA

2. Isomérisation du citrate en isocitrate

Le citrate ne peut pas subir de décarboxylation oxydative en raison de la position de son hydroxyle qui est tertiaire ; il doit donc être préalablement isomérisé en isocitrate qui possède un hydroxyle secondaire. La réaction passe par un intermédiaire, le *cis*-aconitate ; elle est catalysée par l'aconitase qui est une protéine fer-soufre où un atome de fer non lié à des cystéines en se liant à l'un des groupes carboxyle du citrate facilite les réactions de déshydratation puis de réhydratation (*Figure 11.4*). L'aconitase reconnaît le citrate au niveau de trois points, ce qui la conduit à considérer le citrate comme une molécule prochirale et à donner uniquement l'isocitrate tel que représenté dans la figure 11.2.

H_2O — *Aconitase* — H_2O — *Aconitase*

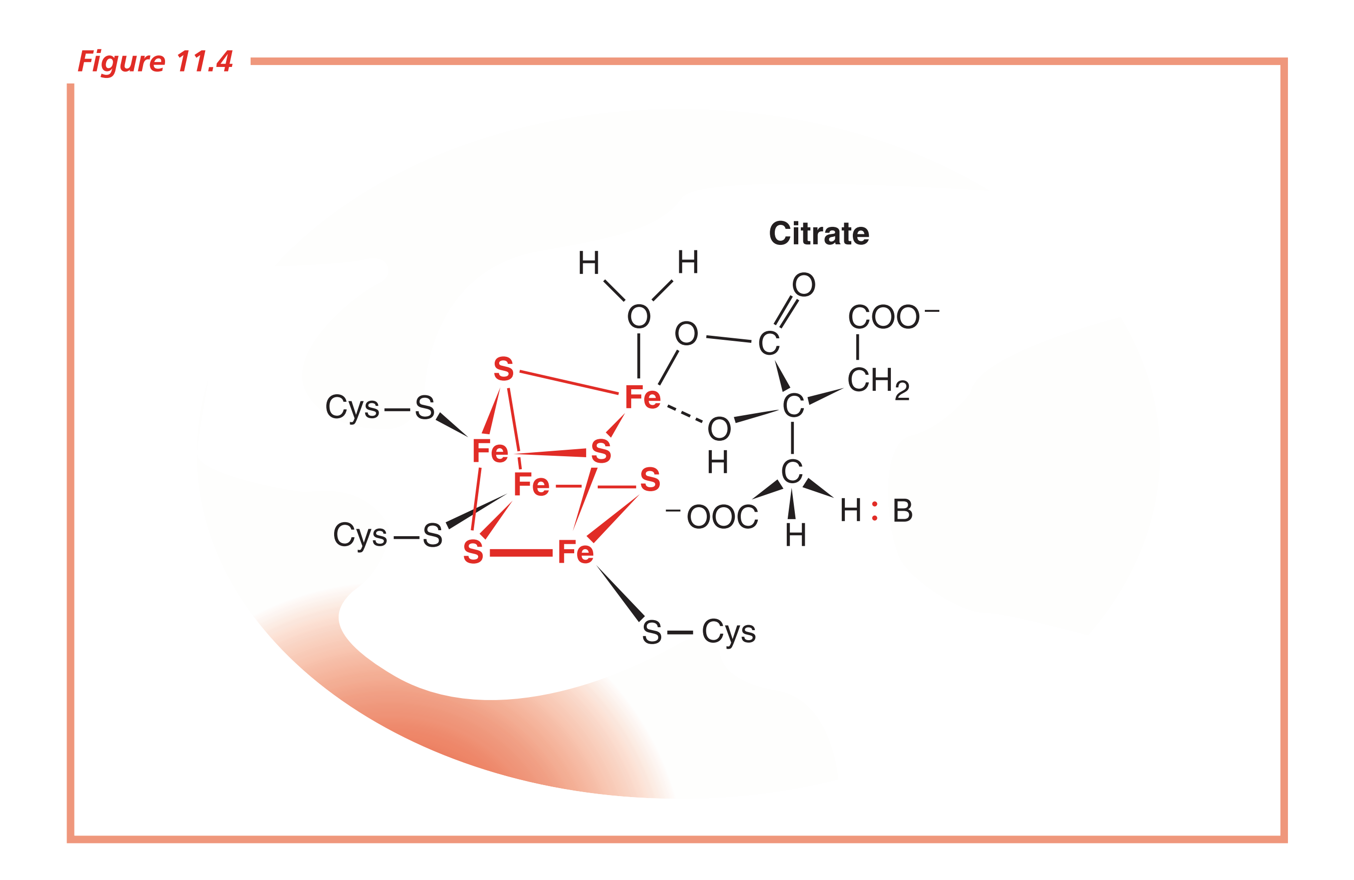
Citrate ⇌ ***cis*-Aconitate** ⇌ **Isocitrate**

3. Oxydation et décarboxylation de l'isocitrate en α-cétoglutarate

L'oxydation et la décarboxylation de l'isocitrate est catalysée par l'isocitrate déshydrogénase NAD-dépendante mitochondriale. Elle est à distinguer de l'isocitrate déshydrogénase NADP-dépendante, qui est à la fois cytosolique et mitochondriale et dont la fonction est de créer du NADPH (p. 176).

NAD^+ → $NADH + H^+$ — *Isocitrate déshydrogénase* — $+ CO_2$

Isocitrate → **α-Cétoglutarate**



4. Décarboxylation oxydative de l'α-cétoglutarate en succinyl CoA

La décarboxylation oxydative de l'α-cétoglutarate en succinyl CoA par l'α-cétoglutarate déshydrogénase lors du cycle de l'acide citrique ressemble étroitement à celle du pyruvate (p. 222). Elle est assumée, elle aussi, par un complexe de trois types d'enzymes : une α-cétoglutarate déshydrogénase (E_1) et une transsuccinylase (E_2), dont les structures sont très proches de celles des enzymes de la pyruvate déshydrogénase, et une dihydrolipoyl déshydrogénase (E_3) identique à celle de la pyruvate déshydrogénase ; les coenzymes sont les mêmes : TPP, lipoamide, CoA, FAD et NAD ; les mécanismes de réaction sont entièrement analogues.

COO^-
CH_2
CH_2
$C(=O)COO^-$

NAD^+ + CoA → + **NADH** + H^+

α-Cétoglutarate déshydrogénase

COO^-
CH_2
CH_2
$C(=O)$S-CoA

+ CO_2

α-Cétoglutarate **Succinyl CoA**

5. Conversion du succinyl CoA en succinate

Le succinyl CoA est un thioester dont le $\Delta G°'$ d'hydrolyse, d'environ -8 kcal mol^{-1}, est comparable à celui des liaisons anhydride d'acide des nucléosides triphosphate. Au sein de la cellule, le clivage de la liaison thioester du succinyl CoA par la succinyl CoA synthétase, hétérodimère de type $\alpha_2\beta_2$, est couplée à la phosphorylation d'un nucléoside diphosphate purique, habituellement le GDP (*Figure 11.5*). Le CoA est tout d'abord déplacé par l'orthophosphate avec création d'un autre composé riche en énergie, le succinyl phosphate ; le phosphoryle de ce dernier est transféré à un résidu histidine de la sous-unité α et la phosphohistidine transfère son groupe phosphoryle à un nucléoside diphosphate lié à la sous-unité β au niveau d'un reploiement de Rossmann. Cette étape réversible est la seule phosphorylation au niveau du substrat du cycle de l'acide citrique.

$$\underset{\text{Succinyl CoA}}{^{-}OOC-CH_2-CH_2-CO-S\text{-}CoA} + GDP + P_i \xrightarrow{\text{Succinyl CoA synthétase}} \underset{\text{Succinate}}{^{-}OOC-CH_2-CH_2-COO^{-}} + GTP + CoA\text{–}SH$$

6. Oxydation du succinate en oxaloacétate

L'ultime phase du cycle de l'acide citrique qui régénère l'oxaloacétate à partir du pyruvate met en œuvre un motif métabolique récurrent de trois réactions, utilisé aussi dans la synthèse ou la dégradation des acides gras (p. 192) ainsi que dans la dégradation des certains aminoacides. Un groupe méthylène $-CH_2-$ est converti en un groupe carbonyle en trois étapes : une oxydation, une hydratation et une deuxième oxydation, avec extraction d'énergie sous la forme d'une molécule de $FADH_2$ et d'une molécule de NADH.

$$\underset{\text{Succinate}}{^{-}OOC-CH_2-CH_2-COO^{-}} \xrightarrow{FAD \rightarrow FADH_2} \underset{\text{Fumarate}}{^{-}OOC-CH=CH-COO^{-}} \xrightarrow{H_2O} \underset{\text{L-Malate}}{^{-}OOC-CH(OH)-CH_2-COO^{-}} \xrightarrow{NAD^{+} \rightarrow NADH + H^{+}} \underset{\text{Oxaloacétate}}{^{-}OOC-CO-CH_2-COO^{-}}$$

Figure 11.5

Succinyl CoA

Succinate

GTP

+ GDP

STŒCHIOMÉTRIE DU CYCLE DE L'ACIDE CITRIQUE

Le bilan du cycle de l'acide citrique s'établit donc ainsi. Un groupe de deux atomes de carbone, l'acétyl CoA, est entré dans le cycle en se condensant avec l'oxaloacétate. Deux atomes de carbones en sont sortis sous forme de deux molécules de CO_2 résultant de la décarboxylation oxydative de l'isocitrate et de l'α-cétoglutarate. Il convient de remarquer que les deux atomes de carbone de ces deux molécules de CO_2 ne sont pas ceux qui sont entrés sous la forme d'acétyl CoA. L'énergie résultant de ces réactions est conservée sous forme de trois molécules de NADH + H^+, une molécule de GTP et une molécule de $FADH_2$. À la fin du cycle, l'oxaloacétate est régénéré.

DES INTERMÉDIAIRES DU CYCLE DE L'ACIDE CITRIQUE SONT D'IMPORTANTS PRÉCURSEURS BIOSYNTHÉTIQUES

Le cycle de l'acide citrique n'est pas uniquement la voie directe d'oxydation de l'acétyl CoA en CO_2 ; c'est aussi une voie par laquelle les cellules sont susceptibles de synthétiser des modules biochimiques à partir desquels seront élaborés des glucides, des lipides, des porphyrines et certains aminoacides à l'origine de purines, de pyrimidines (*Figure 11.6*). Ainsi, la plupart des atomes de carbone des porphyrines viennent du succinyl CoA et nombre d'aminoacides dérivent de l'α-cétoglutarate ou de l'oxaloacétate.

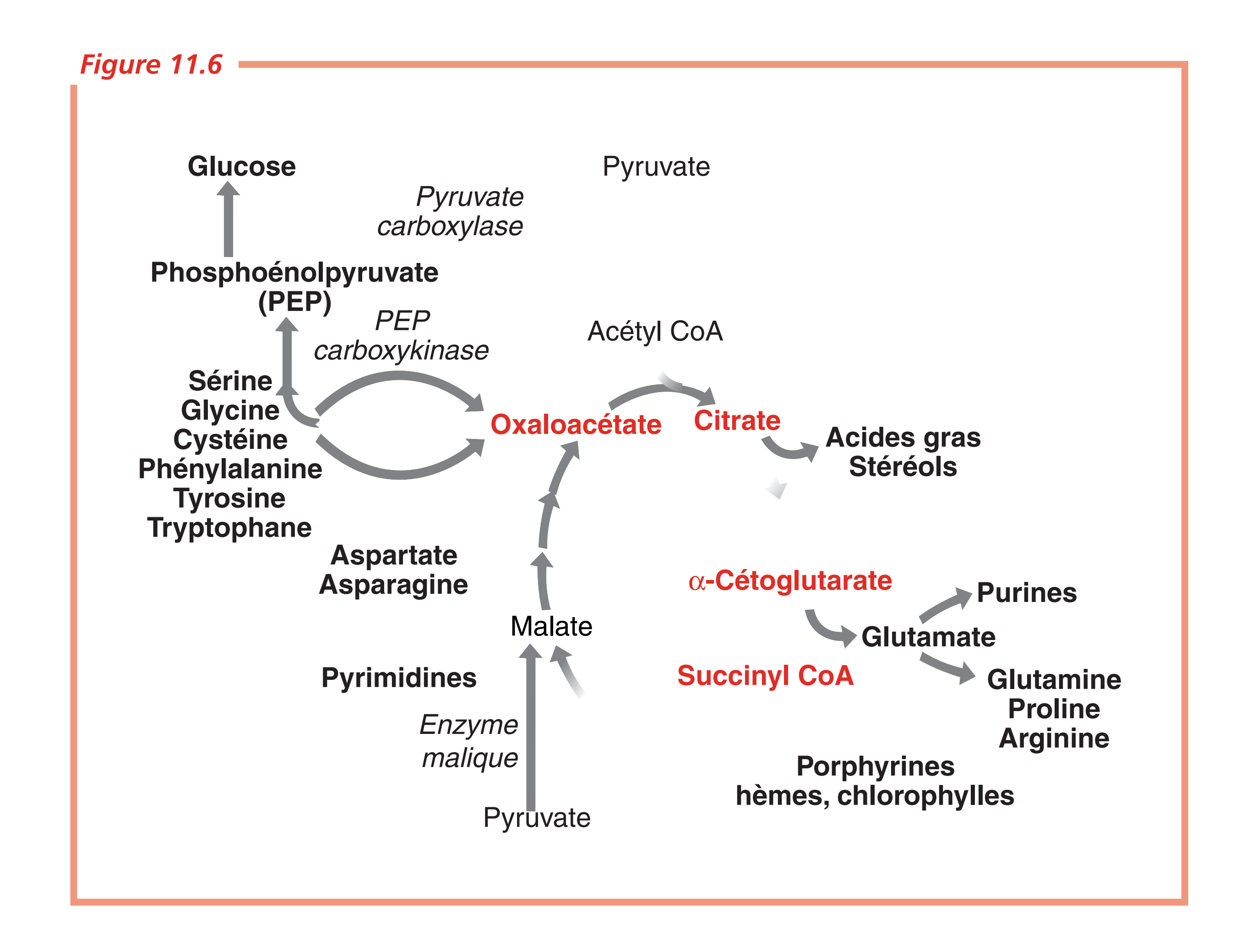
Lorsque des intermédiaires ont été utilisés comme précurseurs biosynthétiques, ils doivent être régénérés par des réactions dites anaplérotiques afin que l'efficacité du cycle de l'acide citrique ne soit pas réduite (*Figure 11.6*). Les Mammifères n'ont pas d'enzymes permettant la conversion de l'acétyl CoA en oxaloacétate. Cependant, ils disposent d'un important enzyme, la pyruvate carboxylase, qui permet la formation de l'oxaloacétate à partir du pyruvate et du CO_2 :

$$\text{Pyruvate} + CO_2 + \text{ATP} + H_2O \rightarrow \text{oxaloacétate} + \text{ADP} + P_i + 2H^+$$

Cet enzyme, dont le groupe prosthétique, la biotine, porte un groupe monocarboné dans son niveau d'oxydation les plus élevé, le CO_2, a l'acétyl CoA comme activateur allostérique ; en effet, un taux élevé d'acétyl CoA signifie un besoin d'oxalate. La pyruvate carboxylase intervient aussi dans la gluconéogenèse (p. 184). Ainsi, lorsque la charge énergétique est faible, l'oxaloacétate recharge le cycle de l'acide citrique ; lorsque la charge énergétique est élevée, il est converti en glucose.

De plus, l'oxaloacétate peur être formé à partir du pyruvate par l'enzyme malique ou encore à partir du phosphoénolpyruvate (PEP) par la PEP carboxykinase ou la PEP carboxylase.

Figure 11.6



LE CYCLE DE L'ACIDE CITRIQUE EST CONTRÔLÉ EN PLUSIEURS POINTS

Étant donné le rôle central joué par le cycle de l'acide citrique dans le métabolisme cellulaire, ce dernier doit être étroitement contrôlé. Les deux plus importants points de contrôle sont situés au niveau des enzymes allostériques que sont l'isocitrate déshydrogénase et l'α-cétoglutarate déshydrogénase. Ainsi, l'isocitrate déshydrogénase est stimulée par l'ADP qui augmente l'affinité de l'enzyme pour les substrats et les liaisons de l'isocitrate, du NAD^+, du Mg^{2+} et de l'ADP sont coopératives. En revanche, le NADH et l'ATP sont inhibiteurs. L'α-cétoglutarate déshydrogénase subit un contrôle semblable à celui de la pyruvate déshydrogénase ; elle est inhibée par les produits de la réaction, le succinyl CoA et le NADH, et par une charge énergétique élevée.

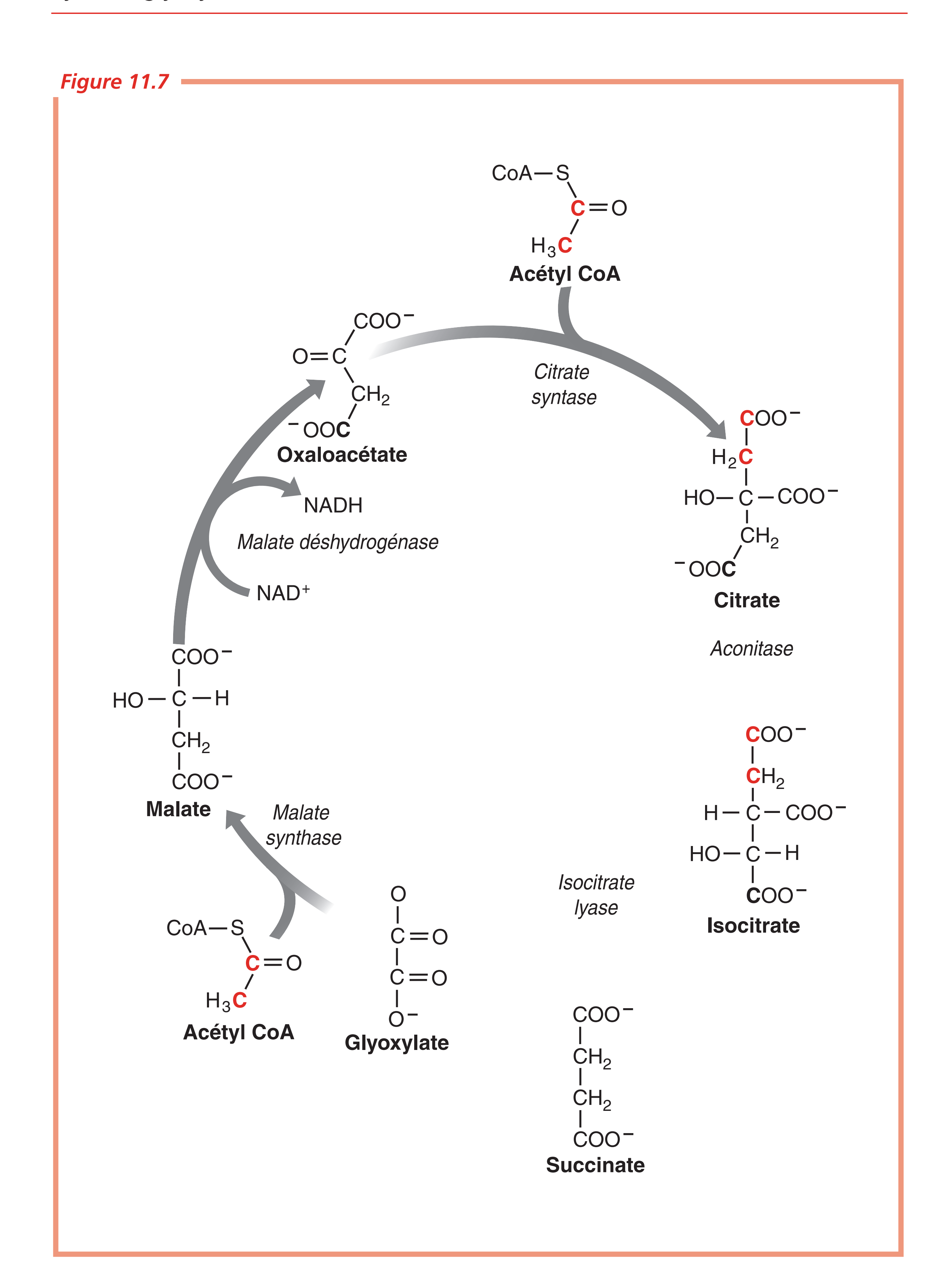
CYCLE DU GLYOXYLATE

Comme il vient d'être exposé, les Vertébrés ne peuvent pas convertir l'acétyl CoA en glucose ; en particulier, ils ne peuvent pas synthétiser du glucose à partir des acides gras étant donné que le catabolisme de ces derniers conduit exclusivement à l'acétyl CoA. Cependant, nombre de bactéries et de végétaux peuvent se développer sur de l'acétyl CoA ou même de l'acétate, étant donné que dans ces organismes l'acétate peut être transformé en acétyl CoA par une acétyl CoA synthétase, avec l'ATP comme source d'énergie.

Pour produire de l'énergie et des intermédiaires biosynthétiques, les Bactéries et les végétaux utilisent alors une voie, dite cycle du glyoxylate, qui convertit les unités acétyle en succinate en court-circuitant les deux étapes de décarboxylation du cycle de l'acide citrique (*Figure 11.6*). Au lieu d'être décarboxylé, l'isocitrate est clivé par l'isocitrate lyase en succinate et glyoxylate. Le succinate est disponible pour des processus biosynthétiques ; en particulier, il peut être converti en glucides grâce à une combinaison du cycle de l'acide citrique et de la gluconéogenèse. Par ailleurs, le glyoxylate se condense avec une deuxième molécule d'acétyl CoA pour donner le malate est ensuite oxydé en oxaloacétate.
Le bilan global de ces réactions est :

$$2 \text{ Acétyl CoA} + NAD^+ + 2H_2O \rightarrow \text{succinate} + 2\text{CoA} + NADH + H^+$$

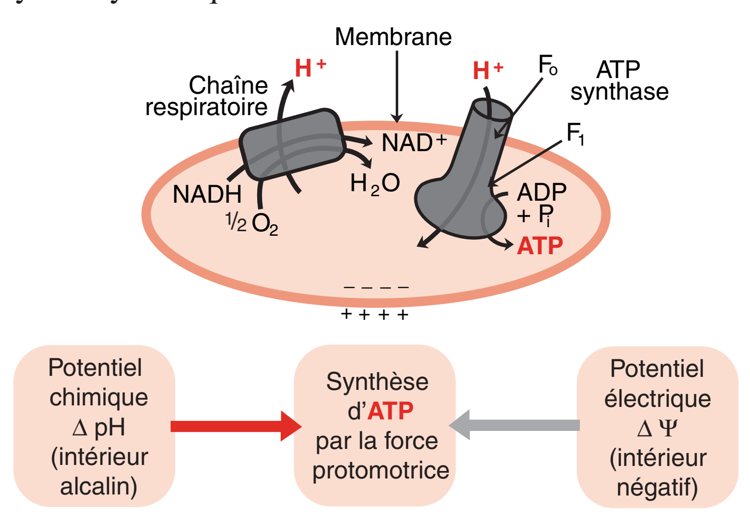
À la différence du cycle de l'acide citrique qui a lieu dans les mitochondries, le cycle du glyoxylate s'effectue dans des organites dénommés glyoxysomes. Les enzymes communs aux deux cycles ont deux isoenzymes, l'un pour les mitochondries, l'autre pour les glyoxysomes. Néanmoins, les activités des deux cycles sont coordonnées.


Figure 11.7
CoA—S
C=O
H3C
Acétyl CoA
Citrate
syntase
COO⁻
O=C
CH2
⁻OOC
Oxaloacétate
NADH
Malate déshydrogénase
NAD+
COO⁻
H2C
HO—C—COO⁻
CH2
⁻OOC
Citrate
Aconitase
COO⁻
HO—C—H
CH2
COO⁻
Malate
Malate
synthase
COO⁻
CH2
H—C—COO⁻
HO—C—H
COO⁻
Isocitrate
Isocitrate
lyase
CoA—S
C=O
H3C
Acétyl CoA
O
C=O
C=O
O⁻
Glyoxylate
COO⁻
CH2
CH2
COO⁻
Succinate

Chapitre 12

Phosphorylation oxydative

Les cellules bactériennes chimiotrophes et les cellules eucaryotes peuvent synthétiser l'ATP à partir d'ADP et de P_i par phosphorylation oxydative. Ce processus est ainsi dénommé parce qu'il couple la phosphorylation de l'ADP par une ATP synthase et l'oxydation d'un substrat, le NADH ou le $FADH_2$, réalisée au niveau d'une chaîne de transport d'électrons, dite chaîne respiratoire ; le couplage est effectué par l'intermédiaire d'un flux de protons. Il est donc fondamentalement différent de la phosphorylation au niveau du substrat qui met en jeu des métabolites solubles possédant des phosphoryles de haut pouvoir de transfert et des enzymes cytosoliques.

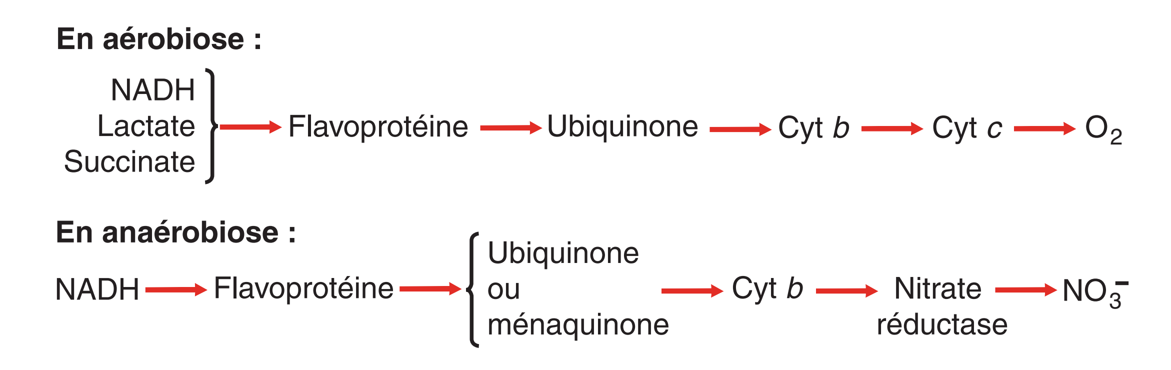


Une telle compréhension de la synthèse de l'ATP dans les mitochondries est fondée sur la théorie chimiosmotique de Peter Mitchell selon laquelle une différence de concentration des protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne constitue un réservoir pour l'énergie extraite des réactions biologiques d'oxydation. Cette théorie s'est révélée très générale ; elle permet d'expliquer la phosphorylation oxydative, mais aussi la photophosphorylation et se présente donc comme l'un des principes unificateurs de la biologie.

Nous décrirons tout d'abord les constituants de quelques chaînes respiratoires, en particulier ceux de la chaîne respiratoire mitochondriale des Eucaryotes dont nous étudierons l'organisation en volumineux complexes fonctionnels dans la membrane mitochondriale interne où cheminent les électrons puis nous considérerons les mouvements des protons qui accompagnent les déplacements des électrons. Nous tournerons ensuite notre attention vers le remarquable complexe enzymatique qui, par catalyse rotationnelle, capte l'énergie du flux des protons à travers lui pour synthétiser l'ATP à partir de l'ADP et du P_i.

TRANSFERT D'ÉLECTRONS, POMPAGE DE PROTONS ET PHOSPHORYLATION OXYDATIVE

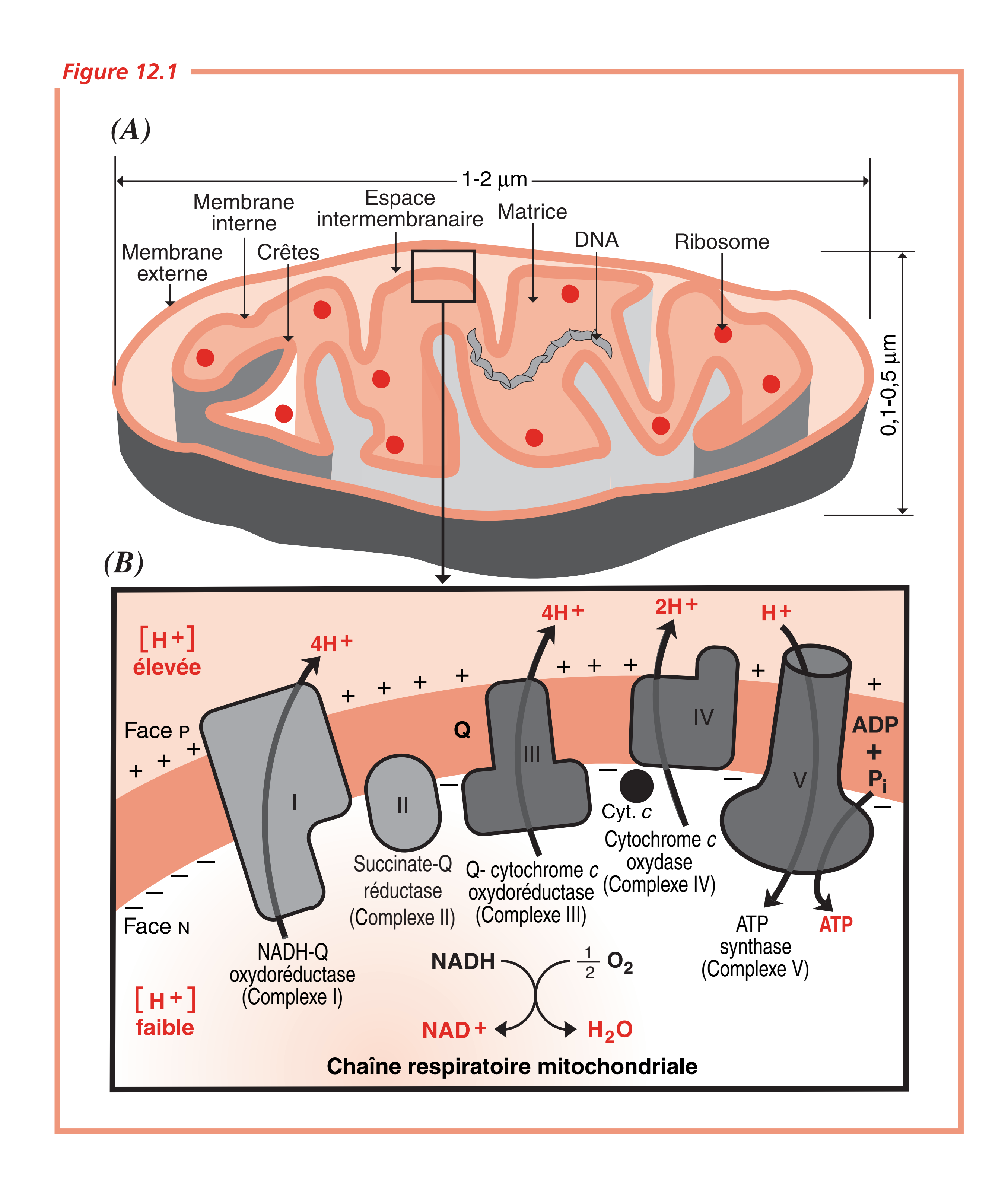
La plupart des cellules bactériennes chimiotrophes tirent leur énergie, non pas de la phosphorylation au niveau du substrat, mais de l'oxydation de substrats organiques ou inorganiques. L'énergie ainsi libérée conduit à la création d'une force protomotrice susceptible d'être utilisée pour la synthèse d'ATP. Ce processus s'effectue grâce à la présence de la membrane plasmique imperméable aux protons où sont localisées des chaînes de transport d'électrons, qui créent un gradient de protons, ainsi qu'une ATP synthase, qui utilise ce gradient pour synthétiser l'ATP à partir d'ADP et de P_i. Les diverses chaînes respiratoires bactériennes, où l'énergie des électrons est libérée progressivement, sont constituées de flavoprotéines, de protéines fer-soufre, de quinones et de cytochromes. Ainsi, chez *Escherichia coli* :



Dans les cellules eucaryotes, la phosphorylation oxydative a lieu dans les mitochondries. Ces dernières (*Figure 12.1A*) possèdent deux membranes, une membrane externe et une membrane interne dont les nombreux replis forment les crêtes. Elles présentent donc deux compartiments, l'espace intermembranaire et la matrice limitée par la membrane interne. La membrane mitochondriale externe est perméable à la plupart des ions et des petites molécules en raison de la présence de porine, protéine transmembranaire qui y forme de larges pores. En revanche, la membrane mitochondriale interne est imperméable aux ions, en particulier aux protons.

La membrane interne des mitochondries (*Figure 12.1B*) possède trois complexes enzymatiques respiratoires : la NADH-Q oxydoréductase, ou Complexe I, la Q-cytochrome *c* oxydoréductase, ou Complexe III, et la cytochrome *c* oxydase, ou Complexe IV, susceptibles de pomper des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire ; associés à deux transporteurs mobiles, l'ubiquinone, ou coenzyme Q, et le cytochrome *c*, ils constituent la chaîne respiratoire mitochondriale. La membrane interne contient aussi une succinate-Q réductase, ou Complexe II, qui transporte vers l'ubiquinone les électrons du $FADH_2$ de la succinate déshydrogénase du cycle de l'acide citrique mais ne pompe pas de protons. Deux autres enzymes, l'acyl CoA déshydrogénase et la glycérol phosphate déshydrogénase, transfèrent de même les électrons de haut potentiel du $FADH_2$ à Q pour former QH_2 . La membrane interne possède enfin une ATP synthase ou Complexe V.

Figure 12.1



Lorsque les électrons de haut potentiel de transfert du NADH ou du $FADH_2$ s'écoulent dans la chaîne respiratoire, des protons sont pompés à travers la membrane interne, de la matrice vers l'espace intermembranaire. De l'ATP est synthétisé quand les protons reviennent dans la matrice à travers l'ATP synthase. L'oxydation du NADH ou du $FADH_2$ et la phosphorylation de l'ADP sont donc couplées grâce à ce flux transmembranaire de protons.

LES ÉLECTRONS DE HAUT POTENTIEL DE TRANSFERT DU NADH ET DU $FADH_2$ ACTIVENT LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE

Les électrons de haut potentiel de transfert du NADH et du $FADH_2$ contenus dans les mitochondries cèdent leur énergie aux complexes respiratoires (*Figure 12.2*). Cette énergie est libérée progressivement au niveau des différents constituants de la chaîne respiratoire *(Tableau 12.1)*. Cet apport d'énergie permet aux complexes d'effectuer la translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire et de créer ainsi une force protomotrice qui résulte alors de la concentration de protons plus forte dans l'espace intermembranaire que dans la matrice. Les électrons de haut potentiel de transfert du NADH et du $FADH_2$ sont finalement transférés sur l'oxygène moléculaire O_2 qui est réduit en H_2O.

Le NADH, dont le potentiel de réduction standard $E°'$ est de – 0,32 V, et le $FADH_2$ des flavoprotéines, dont le potentiel de réduction standard $E°'$ est d'environ 0,0 V, peuvent céder deux électrons à O_2, dont le potentiel de réduction standard $E°'$ est de + 0,82 V. Ainsi, lorsque les deux électrons de haut potentiel du NADH sont transférés à O_2, les deux demi-réactions sont :

$$NADH + H^+ \longrightarrow NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \qquad E°' = -0{,}32\ V$$

$$1/2\ O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O \qquad E°' = 0{,}82\ V.$$

La réaction globale :

$$NADH + H^+ + 1/2\ O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O \qquad \Delta E°' = 1{,}14\ V$$

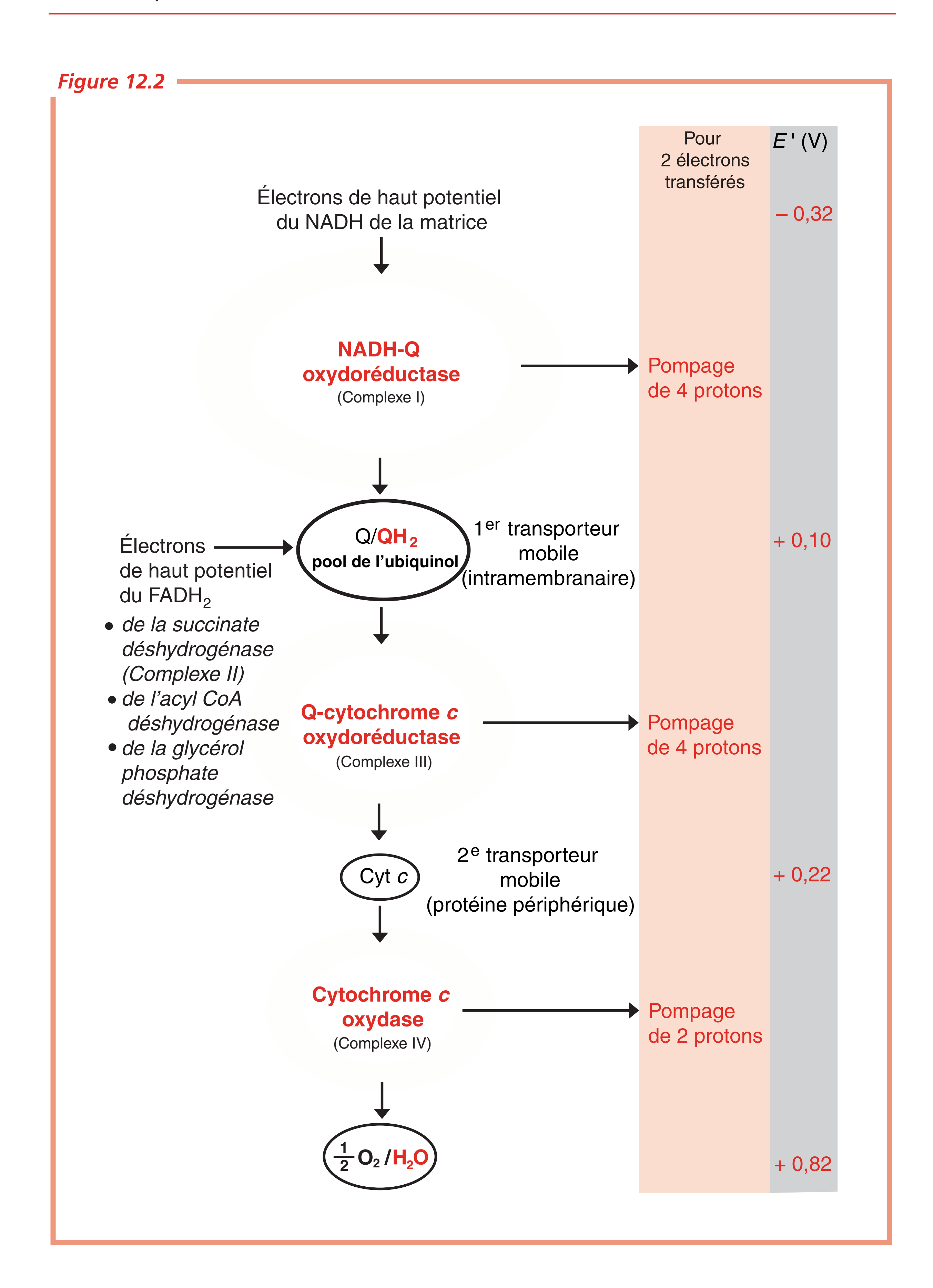
s'accompagne d'une variation d'énergie libre standard de – 220 kJ mol^{-1} :

$$\Delta G°' = -n\mathscr{F}\Delta E°' = -(2)\ (96{,}48)\ (1{,}14) = -220\ kJ\ mol^{-1}.$$

La réaction est donc très exergonique et l'énergie libérée par l'oxydation d'une molécule de NADH est suffisante pour permettre la formation endergonique de plusieurs molécules d'ATP, étant donné que la variation d'énergie libre standard pour la formation d'une molécule d'ATP à partir d'ADP et de P_i n'est que de 30 kJ mol^{-1}.

Tableau 12.1

Complexe	$\Delta E°'$ (V)	$\Delta G°'$ (kJ mol^{-1})
I NADH/QH_2	+ 0,42	– 81
II $FADH_2$/QH_2	+ 0,10	– 19
III QH_2/Cyt *c*	+ 0,12	– 23
IV Cyt *c* /O_2	+ 0,60	– 115


Figure 12.2
Pour 2 électrons transférés
E ' (V)
Électrons de haut potentiel du NADH de la matrice
– 0,32
NADH-Q oxydoréductase
(Complexe I)
Pompage de 4 protons
Q/QH 2
pool de l'ubiquinol
1er transporteur mobile (intramembranaire)
Électrons de haut potentiel du FADH2
• de la succinate déshydrogénase (Complexe II)
• de l'acyl CoA déshydrogénase
• de la glycérol phosphate déshydrogénase
+ 0,10
Q-cytochrome c oxydoréductase
(Complexe III)
Pompage de 4 protons
Cyt c
2e transporteur mobile (protéine périphérique)
+ 0,22
Cytochrome c oxydase
(Complexe IV)
Pompage de 2 protons
1/2 O2 /H2O
+ 0,82

ORIGINE DU NADH ET DU $FADH_2$

Le NADH et le $FADH_2$ des mitochondries résultent essentiellement du métabolisme des glucides, des lipides et mais aussi de divers autres métabolites (*Figure 12.3*). Dans les mitochondries, le pyruvate formé dans le cytoplasme lors de la glycolyse est oxydé par la pyruvate déshydrogénase en acétyl CoA, avec formation de NADH (p. 222) ; les acyl CoA gras y sont oxydés par β-oxydation, avec formation de NADH, de $FADH_2$ et d'acétyl CoA. Le cycle de l'acide citrique oxyde l'acétyl CoA résultant de la décarboxylation du pyruvate ou de la β-oxydation des acyl CoA. Certaines réactions de ce cycle sont accompagnées, elles aussi, de la formation de NADH et de $FADH_2$. Enfin, le NADH cytosolique résultant de l'oxydation du glycéraldéhyde 3-phosphate lors de la glycolyse anaérobie transfère ses deux électrons aux mitochondries grâce à la navette malate-aspartate qui fait apparaître du NADH dans la matrice mitochondriale ou à la navette du glycérol phosphate qui conduit à la formation de $FADH_2$ au sein de la membrane mitochondriale interne.

Le foie, le rein et le cœur mettent en œuvre la navette malate-aspartate (*Figure 12.4*). Au cours d'une réaction catalysée par la malate déshydrogénase cytosolique, le NADH cytosolique réduit l'oxaloacétate en malate. Ce dernier, grâce au transporteur malate-α-cétoglutarate, traverse la membrane interne et pénètre dans la matrice où lors d'une réaction catalysée par la malate déshydrogénase mitochondriale, il réduit le NAD^+ mitochondrial en NADH susceptible de donner directement ses électrons de haut potentiel au Complexe I de la chaîne respiratoire. Environ 2,5 molécules d'ATP (p. 256) seront synthétisées lorsque cette paire d'électrons passera sur O_2. L'oxaloacétate est régénéré par transamination et les transporteurs pourront effectuer une autre navette.

Le muscle squelettique et le cerveau utilisent une navette différente, celle du glycérol 3-phosphate (*Figure 12.5*) qui fait intervenir le dihydroxyacétone phosphate. Cette navette délivre les électrons de haut potentiel du NADH cytosolique au Complexe III de la chaîne respiratoire par l'intermédiaire de l'ubiquinone. Ainsi, environ 1,5 molécule d'ATP seulement seront alors synthétisées par paire d'électrons.

Figure 12.5

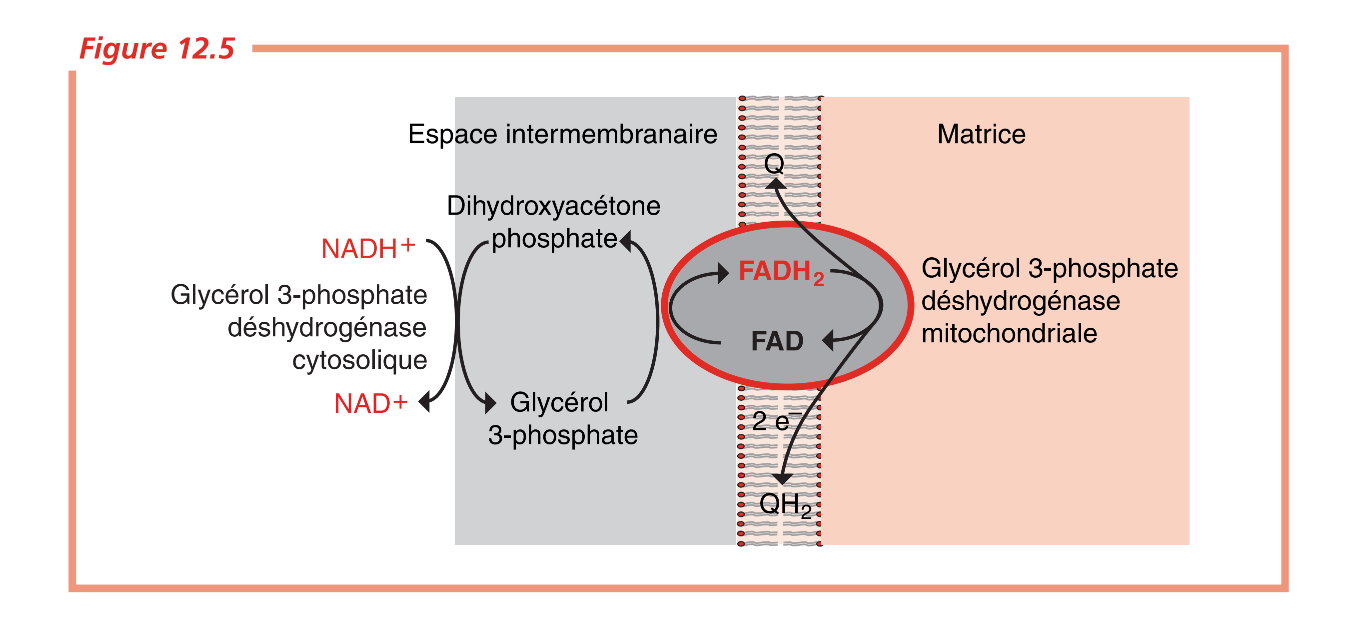


Figure 12.3

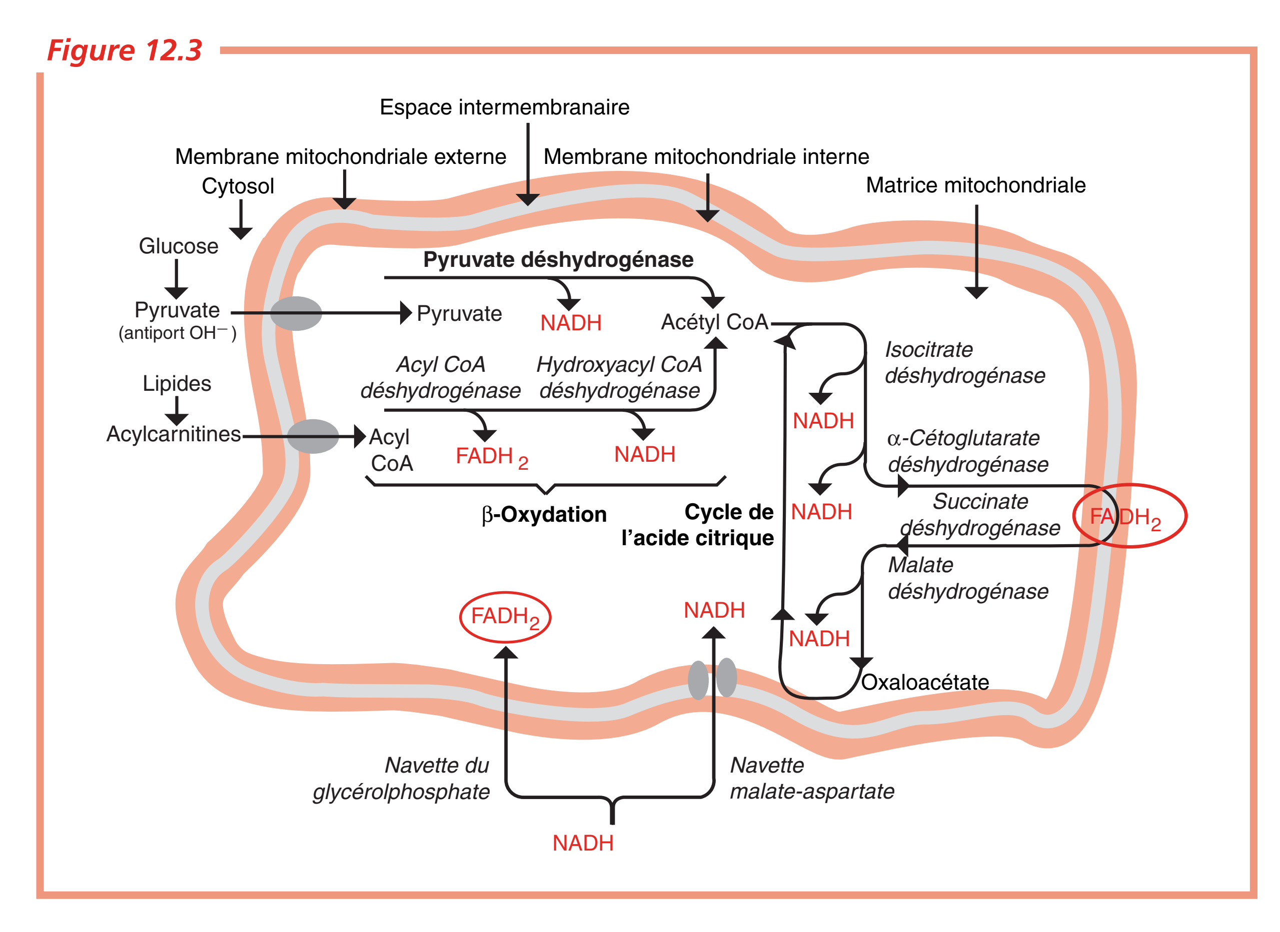
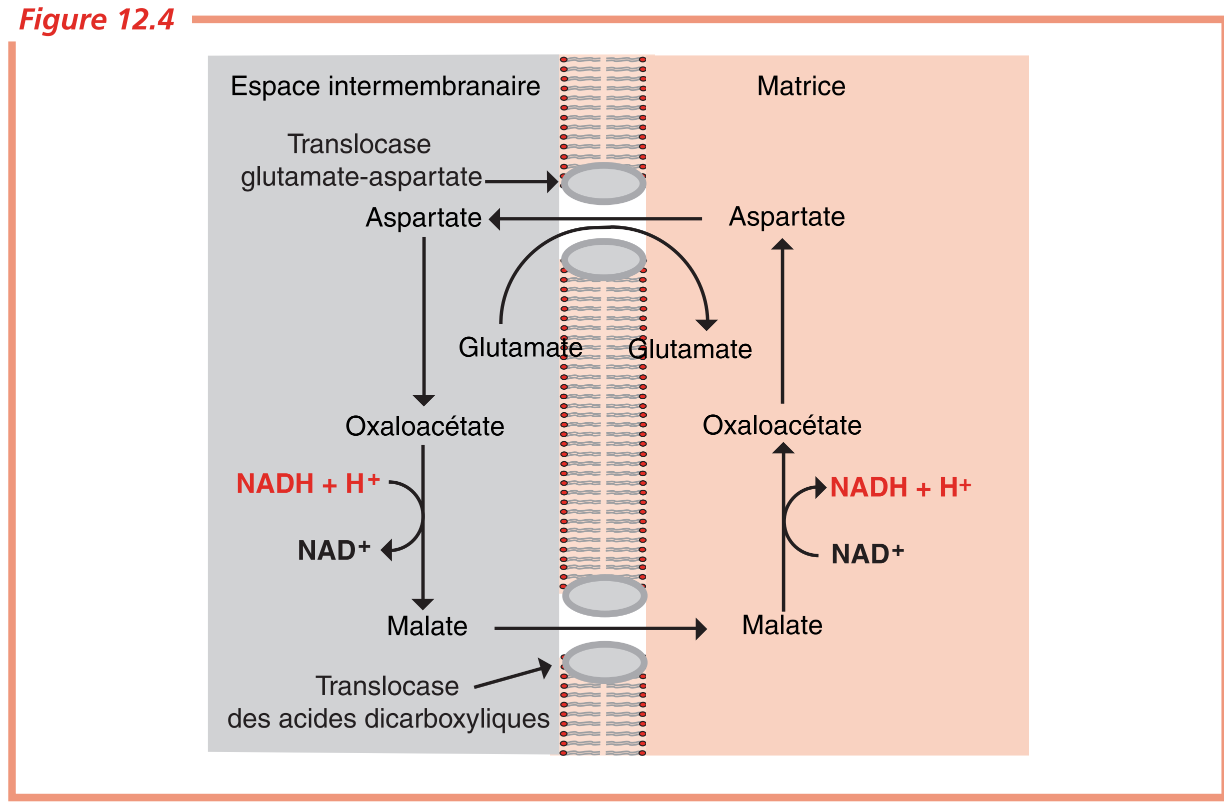


Figure 12.4



NADH-Q OXYDORÉDUCTASE

La NADH-Q oxydoréductase, encore appelée NADH déshydrogénase ou Complexe I, est un système enzymatique très volumineux, d'une masse moléculaire d'environ 900 kDa. Chez les Mammifères, elle est constituée de 42 sous-unités différentes, d'un mononucléotide flavinique, de 7 ou 8 centres fer-soufre différents, de lipides liés par covalence et d'au moins 3 molécules d'ubiquinone liées.

Des études à moyenne résolution ont montré que ce complexe en forme de L était constitué de deux parties assemblées perpendiculairement : une partie hydrophobe codée par le génome mitochondrial insérée dans la membrane interne et un bras matriciel codé par le génome nucléaire (*Figure 12.6A*). Le NADH matriciel se fixe au niveau d'un site de ce dernier, puis donne ses deux électrons de haut potentiel de transfert au groupe prosthétique flavine mononucléotide FMN d'une flavoprotéine qui est réduit en $FMNH_2$. Les électrons du $FMNH_2$ (*Figure 12.6B*) passent ensuite sur d'autres protéines dont les groupes prosthétiques se présentent sous la forme de centres fer-soufre Fe-S au sein desquels les atomes de fer peuvent cycler entre la forme oxydée Fe^{3+} et la forme réduite Fe^{2+} (p. 134). Les électrons sont alors transférés à une molécule d'ubiquinone, appelée aussi coenzyme Q, fermement liée au complexe enzymatique, dont la réduction conduit à la formation d'ubiquinol QH_2 (*Figure 12.6C*). Les électrons de ce dernier passent ensuite à travers d'autres protéines fer-soufre de la partie intramembranaire de la NADH-Q oxydoréductase dont les groupes prosthétiques sont aussi du type Fe-S, pour enfin réduire une molécule d'ubiquinone mobile au sein du core hydrophobe de la membrane mitochondriale interne et participer à la constitution du pool d'ubiquinol intramembranaire.

On ne connaît pas définitivement les changements conformationnels induits par les transferts d'électrons au niveau des nombreuses chaînes polypeptidiques qui constituent la NADH-Q oxydoréductase. On ignore donc aussi comment ces transitions conformationnelles sont couplées au pompage des protons. Cependant, le cheminement des électrons à haut potentiel du NADH jusqu'à QH_2 libère une énergie libre $\Delta G°'$ de – 81 kJ mol^{-1} et permet la translocation de 4 protons par paire d'électrons.

$$NADH + 5\,H_N^+ + Q \longrightarrow NAD^+ + QH_2 + 4\,H_P^+$$

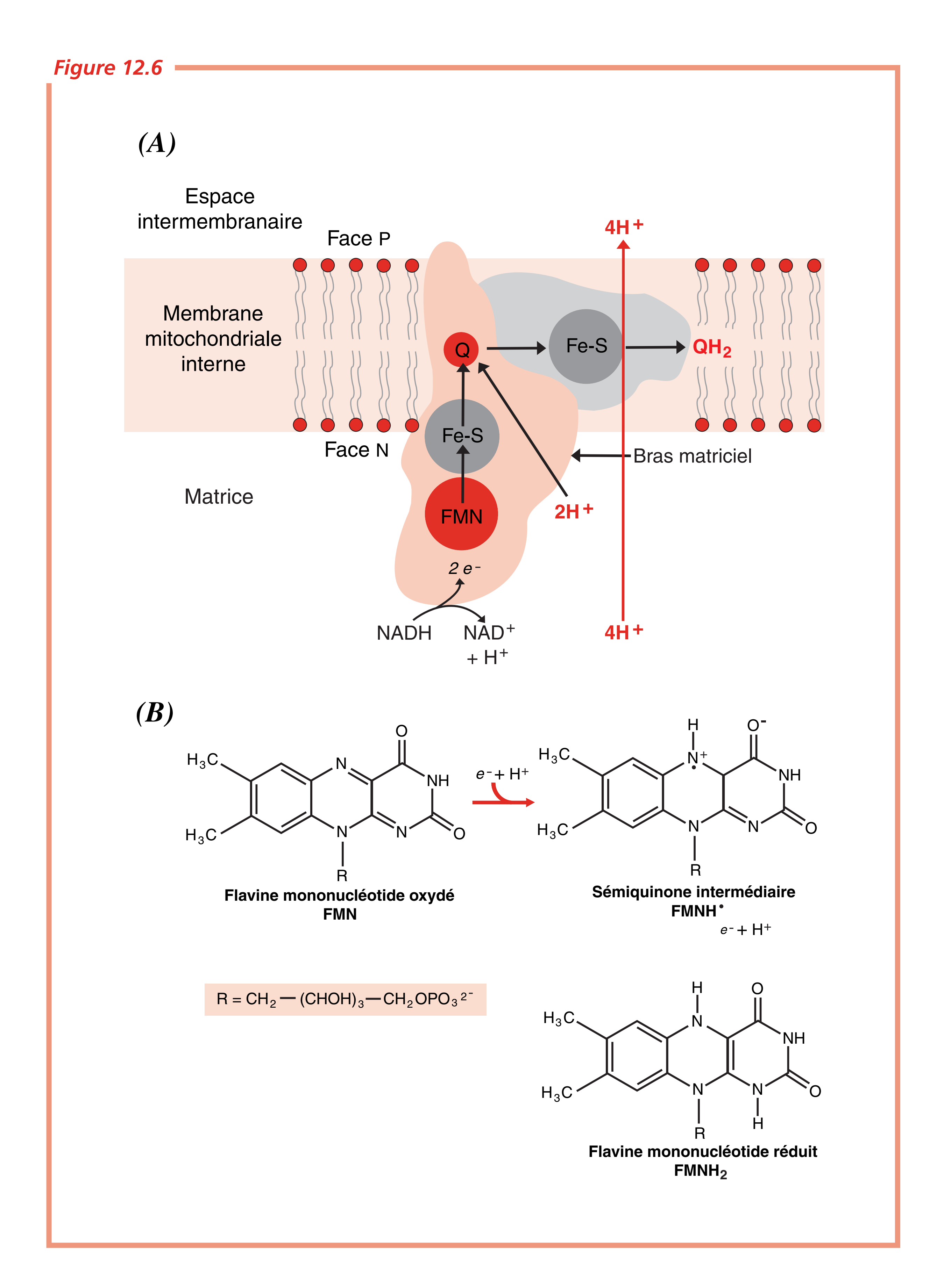
Figure 12.6

(C)

Ubiquinone Q $\xrightarrow{e^- + H^+}$ Semiquinone intermédiaire $Q^{\bar{\cdot}}$ $\xrightarrow{e^- + H^+}$ Ubiquinol QH_2

$R = (CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2)_{10}-H$

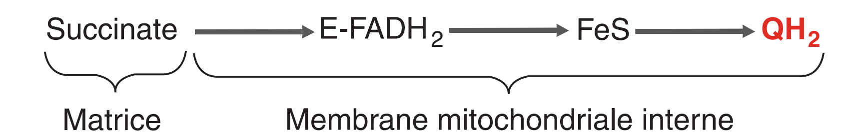
Figure 12.6


(A)
Espace intermembranaire
Face P
4H+
Membrane mitochondriale interne
Q
Fe-S
QH2
Fe-S
Face N
Bras matriciel
Matrice
FMN
2H+
2 e-
NADH
NAD+ + H+
4H+
(B)
e- + H+
Flavine mononucléotide oxydé FMN
Sémiquinone intermédiaire FMNH•
e- + H+
R = CH2 — (CHOH)3 — CH2OPO3 2-
Flavine mononucléotide réduit FMNH2

LES ÉLECTRONS DU $FADH_2$ DES FLAVOPROTÉINES ONT L'UBIQUINONE POUR POINT D'ENTRÉE DANS LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE

Les flavoenzymes, dont le coenzyme est fermement fixé à la protéine, transfèrent les deux électrons à haut potentiel de leur $FADH_2$ au pool de l'ubiquinol. C'est le cas de la succinate déshydrogénase du cycle de l'acide citrique, de l'acyl CoA déshydrogénase de la voie de la β-oxydation et de la glycérol phosphate déshydrogénase mitochondriale (*Figure 12.7*).

La succinate déshydrogénase est l'un des constituants de la succinate-ubiquinone réductase, ou Complexe II, qui est un complexe enzymatique de la membrane mitochondriale interne. Le complexe des Mammifères est formé de quatre sous-unités dont les deux plus grosses, qui contiennent un groupe prosthétique et trois centres fer-soufre, possèdent l'activité succinate déshydrogénase. Les deux autres sous-unités sont impliquées dans le passage des électrons du $FADH_2$ à l'ubiquinone. Le complexe est ancré dans la membrane par un cytochrome de type *b*. Schématiquement, le parcours des électrons s'établit ainsi :



L'acyl CoA déshydrogénase transfère les électrons de son groupe prosthétique $FADH_2$ à celui d'une seconde flavoprotéine hydrosoluble dénommée ETF (*electron transferring flavoprotein*). Les électrons de cette dernière sont acceptés par une protéine fer-soufre de la membrane mitochondriale interne, l'ETF ubiquinone réductase et enfin par l'ubiquinone. Schématiquement, le parcours des électrons s'établit ainsi :



Enfin, la glycérol 3-phosphate déshydrogénase de la membrane mitochondriale interne transfère les électrons de son groupe prosthétique $FADH_2$ à une molécule d'ubiquinone membranaire mobile. Schématiquement, le parcours des électrons s'établit ainsi :

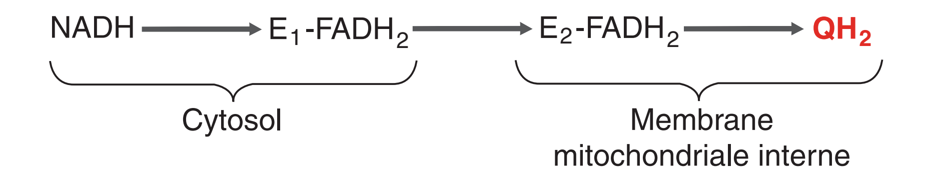
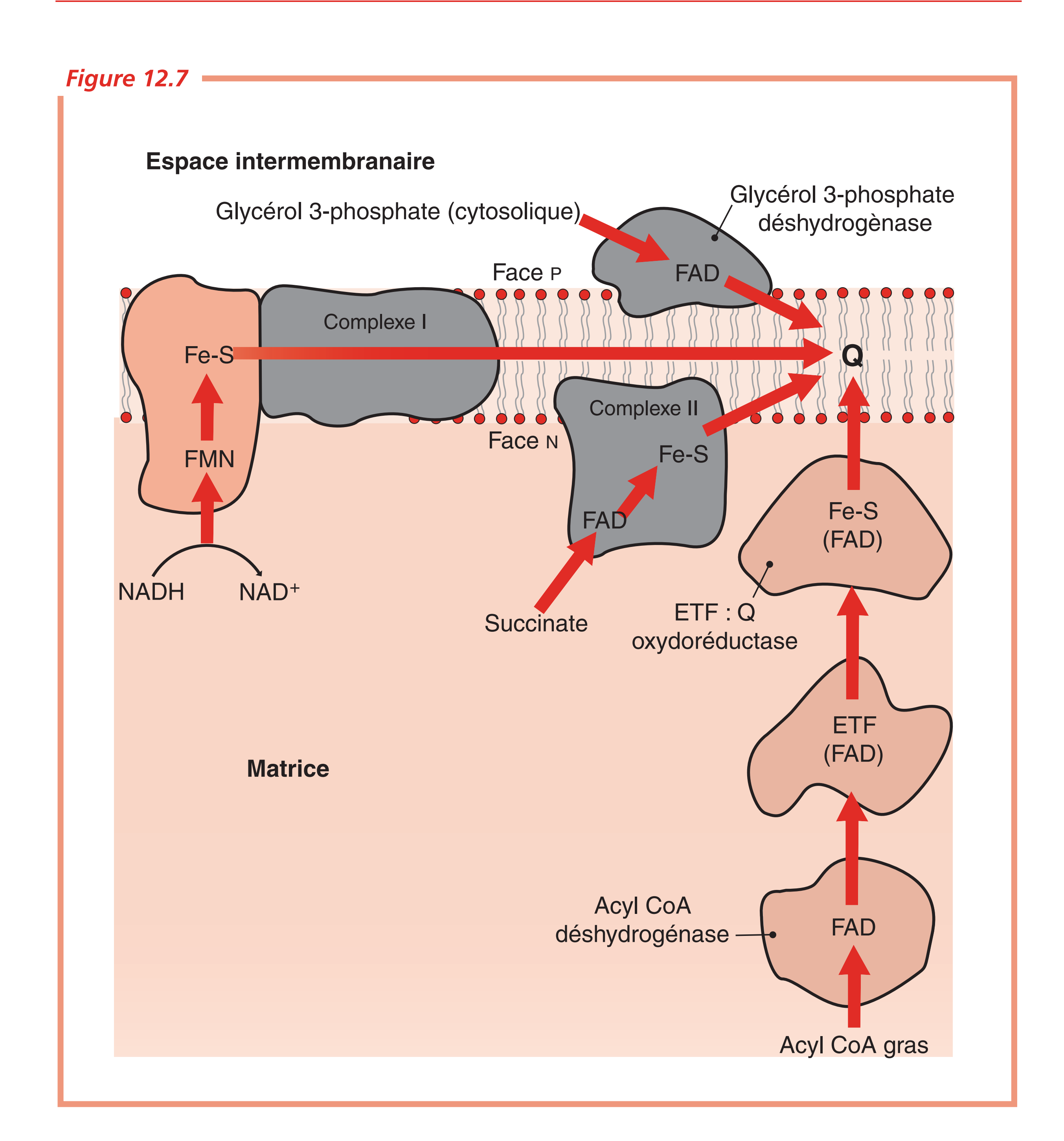


Figure 12.7



Les trois flavoenzymes succinate déshydrogénase, acyl CoA déshydrogénase et glycérol 3-phosphate déshydrogénase enrichissent le pool d'ubiquinol de la membrane mitochondiale interne et alimentent ainsi la cytochrome réductase de la chaîne respiratoire en électrons de haut potentiel de transfert. Contrairement aux autres complexes, ils ne transportent pas de protons hors de la matrice et ils ne participent donc qu'indirectement à la constitution du gradient de concentration de protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne.

Q-CYTOCHROME *C* OXYDORÉDUCTASE

Structure

La Q-cytochrome *c* oxydoréductase, encore appelée cytochrome bc_1 ou Complexe III, est le mieux connu des trois complexes respiratoires. Le complexe des Mammifères est un dimère stable possédant un axe de symétrie d'ordre 2 perpendiculaire à la membrane mitochondriale interne (*Figure 12.8A*). Dans le domaine transmembranaire, les hélices du dimère se répartissent en deux faisceaux compacts.

Chaque monomère, d'une masse moléculaire de 248 kDa, est constitué de onze sous-unités protéiques, dont les séquences des aminoacides sont connues, et de quatre groupes prosthétiques : trois hèmes et un centre fer-soufre. Trois sous-unités, le cytochrome β, la protéine fer-soufre de Rieske et le cytochrome c_1 possèdent les quatre centres d'oxydoréduction assumant la conservation de l'énergie et forment donc le core fonctionnel de la cytochrome réductase (*Figures 12.9A et 12.9B*). Chez les Mammifères, le cytochrome *b* est codé par le génome mitochondrial. Parmi les huit autres sous-unités, six sont des petites protéines qui entourent les métalloprotéines ; les deux autres, qui sont les plus grosses sous-unités du complexe, font face à la matrice mitochondriale.

La structure tridimensionnelle de la Q-cytochrome *c* oxydoréductase a été déterminée à haute résolution (*Figure 12.8B*).

Le cytochrome *b* est constitué de huit hélices transmembranaires et de deux hèmes situés entre les hélices B et D et distants de 21 Å. Ils sont dénommés b_L (L, pour *low*) et b_H (H pour *high*) car l'hème b_L, situé près de la face cytosolique de la membrane, a une affinité pour les électrons plus faible que celle de l'hème b_H, situé près de la face matricielle de la membrane. Ces hèmes sont encore connus sous les noms de b_{565} et b_{562}, respectivement, en raison de leur absorption maximale à ces longueurs d'onde. Les deux hèmes sont identiques mais ont des affinités pour les électrons et des propriétés spectrales différentes en raison d'un environnement polypeptidique différent. Ils constituent deux centres d'oxydoréduction.

La protéine de Rieske est une protéine fer-soufre possédant un centre d'oxydoréduction de type 2Fe-2S inhabituel en ce sens qu'un des atomes de fer est coordonné à deux résidus histidine au lieu de deux résidus cystéine.

Le cytochrome c_1 est ancré dans la membrane par son extrémité C-terminale transmembranaire proche du cytochrome *b*. Sa partie extrinsèque contient un hème qui constitue le quatrième centre d'oxydoréduction de la Q-cytochrome *c* oxydoréductase.



Figure 12.8

(A)
Espace intermembranaire
Membrane interne
Matrice
31 Å
40 Å
79 Å
100 Å
(B)
Cyt c_1
Hème c
Protéine de Rieske
2Fe 2S
Hème b_L
Hème b_H
Cyt b

Cycle Q

La Q-cytochrome *c* oxydoréductase assume le transfert au cytochrome *c* des électrons de l'ubiquinol apportés par la NADH-Q oxydoréductase ou les flavoprotéines. Elle couple cette réaction d'oxydoréduction à la translocation de quatre protons de la matrice à travers la membrane mitochondriale interne et contribue donc à la création du gradient de concentration de protons dans la mitochondrie.

Ces processus sont effectués selon un mécanisme connu sous le nom de cycle Q. La Q-cytochrome *c* oxydoréductase possède deux sites actifs : Q_o et Q_i où peut être présent le coenzyme Q sous ses différents niveaux d'oxydation : ubiquinol QH_2, ubisemiquinone $Q^{\bullet-}$ et ubiquinone Q. La présence et l'emplacement précis de ces sites ont été confirmés récemment dans des cristaux de cytochrome réductase par diffraction des rayons X. Le site Q_o est situé entre la protéine de Rieske et le cytochrome *b*, près de l'hème b_L et de la face cytosolique de la membrane mitochondriale interne. Le site Q_i est localisé dans le cytochrome *b*, près de l'hème b_H, du côté matriciel de la membrane. Les deux sites communiquent avec les phases aqueuses par des canaux. La présence de ces deux sites est un élément essentiel du cycle Q qui évolue en deux étapes.

Dans une première étape (*Figure 12.9A*), l'ubiquinol est oxydé au niveau du site Q_o. L'ubiquinol cédant deux électrons et le cytochrome *c* ne pouvant en accepter qu'un seul, le transfert des électrons à travers la Q-cytochrome *c* oxydoréductase s'opère selon une voie présentant une bifurcation. Un premier électron est transféré le long d'une chaîne de haut potentiel, du centre FeS de la protéine de Rieske ($E°' = +0{,}28$) au cytochrome c_1 ($E°' = +0{,}23$), puis au cytochrome *c* ($E°' = +0{,}22$), protéine périphérique et mobile de l'espace intermembranaire (p. 252). Simultanément, deux protons sont éjectés dans le cytosol. Il en résulte la formation d'ubisemiquinone $Q^{\bullet-}$ dont l'électron est ensuite transféré par l'intermédiaire des hèmes b_L ($E°' = -0{,}03$) et b_H ($E°' = +0{,}05$) du cytochrome *b* au site Q_i où il réduit une molécule d'ubiquinone Q en semiquinone $Q^{\bullet-}$.

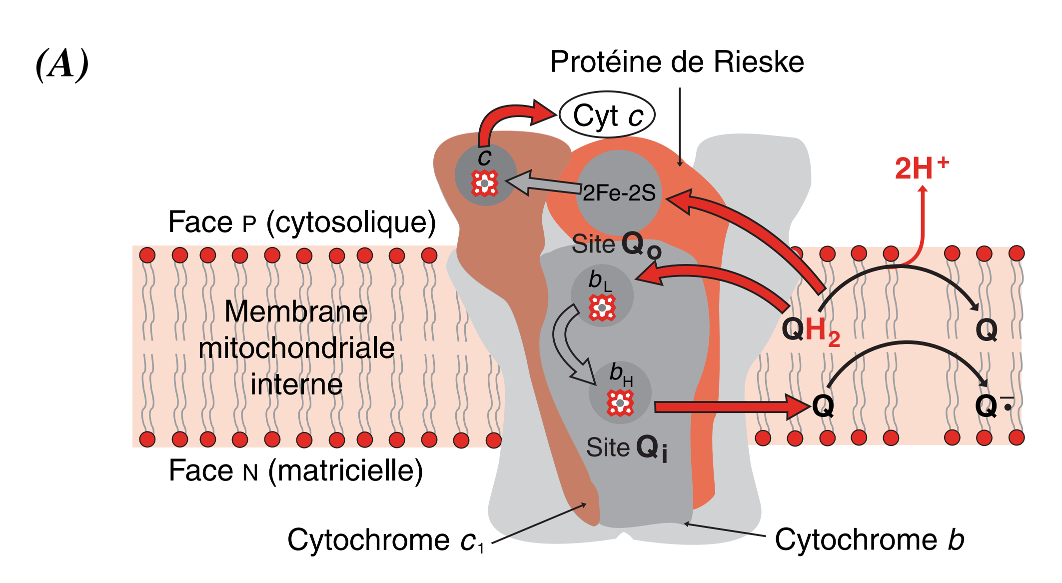
Lors d'une deuxième étape (*Figure 12.9B*), identique à la première, une seconde molécule d'ubiquinol est oxydée dans le site Q_o, mais l'électron de l'ubisemiquinone $Q^{\bullet-}$ est transféré dans le site Q_i où, avec deux protons prélevés dans la matrice, il réduit l'ubisemiquinone déjà présente en ubiquinol qui rejoint le pool.

Le transit des électrons par le site Q_i, grâce à la présence des hèmes b_L et b_H, permet le pompage de quatre protons de la matrice par paire d'électrons transférés. Ce mécanisme contribue donc à la création de la force protomotrice.

$$QH_2 + 2\ \text{Cyt}\ c_1\ (\text{ox}) + 2H_N^+ \longrightarrow Q + 2\ \text{Cyt}\ c_1\ (\text{red}) + 4\ H_P^+$$

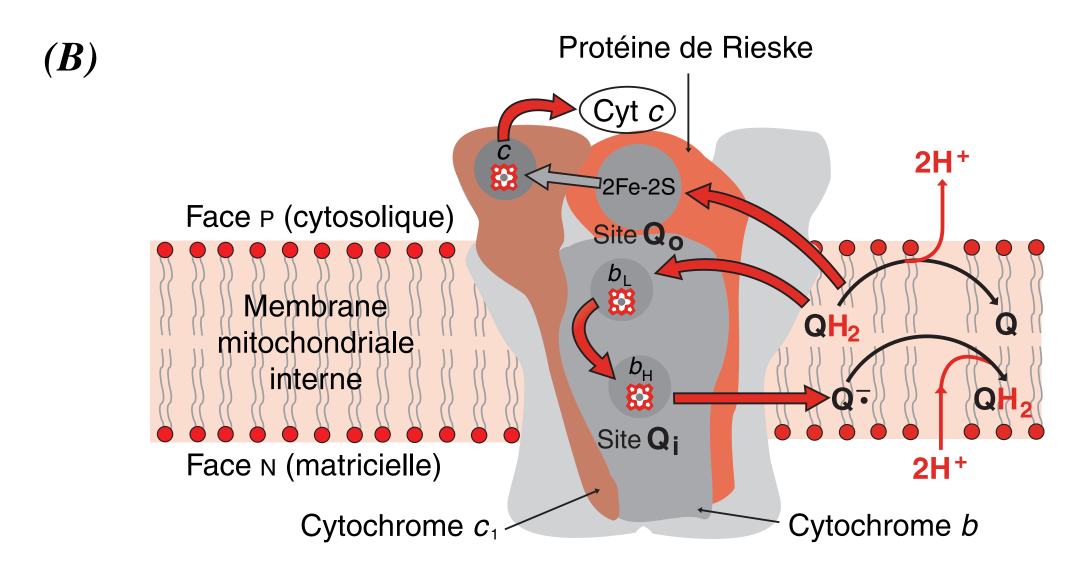
Le caractère propre au cycle Q est la bifurcation des voies des électrons au niveau du site Q_o. Des études cristallographiques ont permis d'en montrer le mécanisme moléculaire. Après le transfert du premier électron de l'ubiquinol à la protéine de Rieske, un changement conformationnel de cette dernière permettrait au centre FeS de s'éloigner de 20 Å du site Q_o, en direction du cytochrome c_1. Ce mouvement lui permettrait de délivrer son électron et assurerait qu'il ne puisse plus fixer le deuxième électron qui devrait alors nécessairement s'orienter vers le site Q_i. Ce serait le premier cas décrit d'un tel mouvement d'un domaine protéique au sein d'un complexe d'oxydoréduction.





Oxydation d'un premier QH_2

$$QH_2 + \text{Cyt } c_1\,(\text{ox}) \longrightarrow Q^{\bullet} + \text{Cyt } c_1\,(\text{red}) + 2H^+_p$$



Oxydation d'un second QH_2

$$QH_2 + \text{Cyt } c_1\,(\text{ox}) + Q^{\bullet} + 2H^+_N \longrightarrow QH_2 + \text{Cyt } c_1(\text{red}) + 2H^+_P + Q$$

Résultante des processus (A) et (B)

$$QH_2 + \text{Cyt } c_1\,(\text{ox}) + 2H^+_N \longrightarrow Q + 2\ \text{Cyt } c_1(\text{red}) + 4H^+_P$$

CYTOCHROME C

Le cytochrome *c* est une protéine périphérique soluble de l'espace intermembranaire mitochondrial associée à la face cytosolique de la membrane interne, de forme approximativement sphérique d'un diamètre de 34 Å. Le cytochrome *c* est constitué d'une unique chaîne polypeptidique de 104 résidus très conservés ; sa structure tridimensionnelle a été déterminée à haute résolution. Cette chaîne est unie par covalence à un hème de type *c* (p. 134). De plus, elle contracte des liaisons avec le fer héminique au niveau d'une histidine 18 et d'une méthionine 80 (*Figure 12.10A*).

En raison de sa mobilité, le cytochrome *c* peut transporter les électrons de la Q-cytochrome *c* oxydoréductase à la cytochrome *c* oxydase. Il entre en contact avec ses deux partenaires de la chaîne respiratoire mitochondriale grâce à la présence, à sa surface, d'un groupe de résidus lysine chargés positivement susceptibles d'établir des interactions avec des groupes chargés négativement de la réductase ou de l'oxydase. Le fer transporte un seul électron à la fois en passant réversiblement de l'état oxydé ferrique Fe^{3+} à l'état réduit ferreux Fe^{2+}.

$$Fe^{3+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+}$$

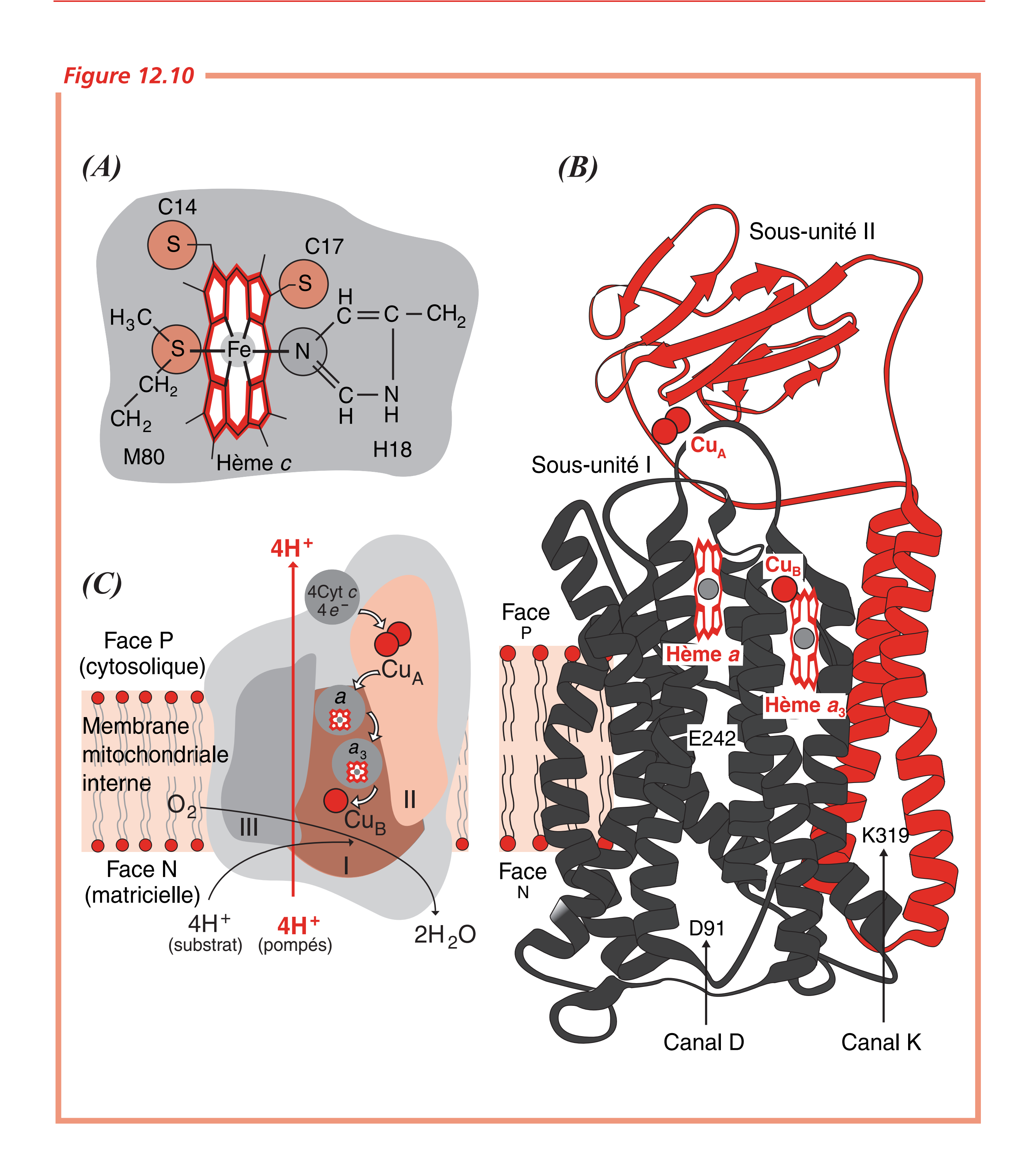
CYTOCHROME C OXYDASE

La cytochrome *c* oxydase, encore appelée cytochrome aa_3 ou Complexe IV, est le dernier des trois complexes respiratoires. Le complexe des Mammifères est un dimère. Chaque monomère, d'une masse de 204 kDa environ, est constitué de treize sous-unités dont les trois principales, les sous-unités I, II et III, sont codées par le génome mitochondrial et forment le core fonctionnel du complexe. Le core est entouré de dix sous-unités plus petites codées par le génome nucléaire.

La structure tridimensionnelle de la cytochrome *c* oxydase a été déterminée à haute résolution par diffraction de rayons X (*Figure 12.10B*). La sous-unité II possède un centre constitué de deux atomes de cuivre, dénommé Cu_A/Cu_A qui ressemble au centre 2Fe-2S des protéines fer-soufre. Elle est la première à recevoir les électrons du cytochrome *c* (*Figure 12.10C*). Ces électrons sont ensuite transférés à la sous-unité I, tout d'abord au niveau d'un hème *a* (p. 134), puis d'un site actif bimétallique Fe-Cu constitué d'un hème a_3 (p. 134) et d'un atome de cuivre dénommé Cu_B. Ce centre hème a_3-Cu_B transfère finalement les électrons à O_2. Fe et Cu cyclent entre les états Fe^{4+}, Fe^{3+} ou Fe^{2+}, et Cu^{2+} ou Cu^+, respectivement, lorsqu'ils participent au transfert des électrons. Les deux hèmes et Cu_B sont unis par six résidus histidine. Deux canaux hydrophiles connectent le site actif à la phase aqueuse de la matrice. Ils sont dénommés D et K, en raison de la présence de résidus conservés, l'aspartate 91 et la lysine 319, respectivement, dans l'enzyme bovin. Un résidu glutamate conservé E 242, situé à l'extrémité du canal D, est essentiel pour le pompage des protons. La sous-unité III contient des phospholipides liés mais son rôle fonctionnel est encore inconnu.

La cytochrome *c* oxydase catalyse le transfert de quatre électrons du cytochrome *c* à l'oxygène moléculaire O_2. Elle assume ainsi la réduction de O_2 en 2 H_2O, ce qui nécessite, outre les quatre électrons venant du cytochrome *c*, quatre protons qui sont prélevés dans la

Figure 12.10



matrice. Un proton étant pompé pour chaque électron transféré, cette réduction est accompagnée par la translocation de quatre autres protons de la matrice qui passent à travers la membrane mitochondriale interne et vont vers l'espace intermembranaire. Les huit protons prélevés dans la matrice transitent par les canaux D et K.

$$4 \text{ Cyt } c_{red} + 8H_N^+ + O_2 \longrightarrow 4 \text{ Cyt } c_{ox} + 4H_P^+ + 2H_2O$$

L'ATP SYNTHASE COUPLE LA SYNTHÈSE D'ATP À LA RENTRÉE DES PROTONS DANS LA MATRICE

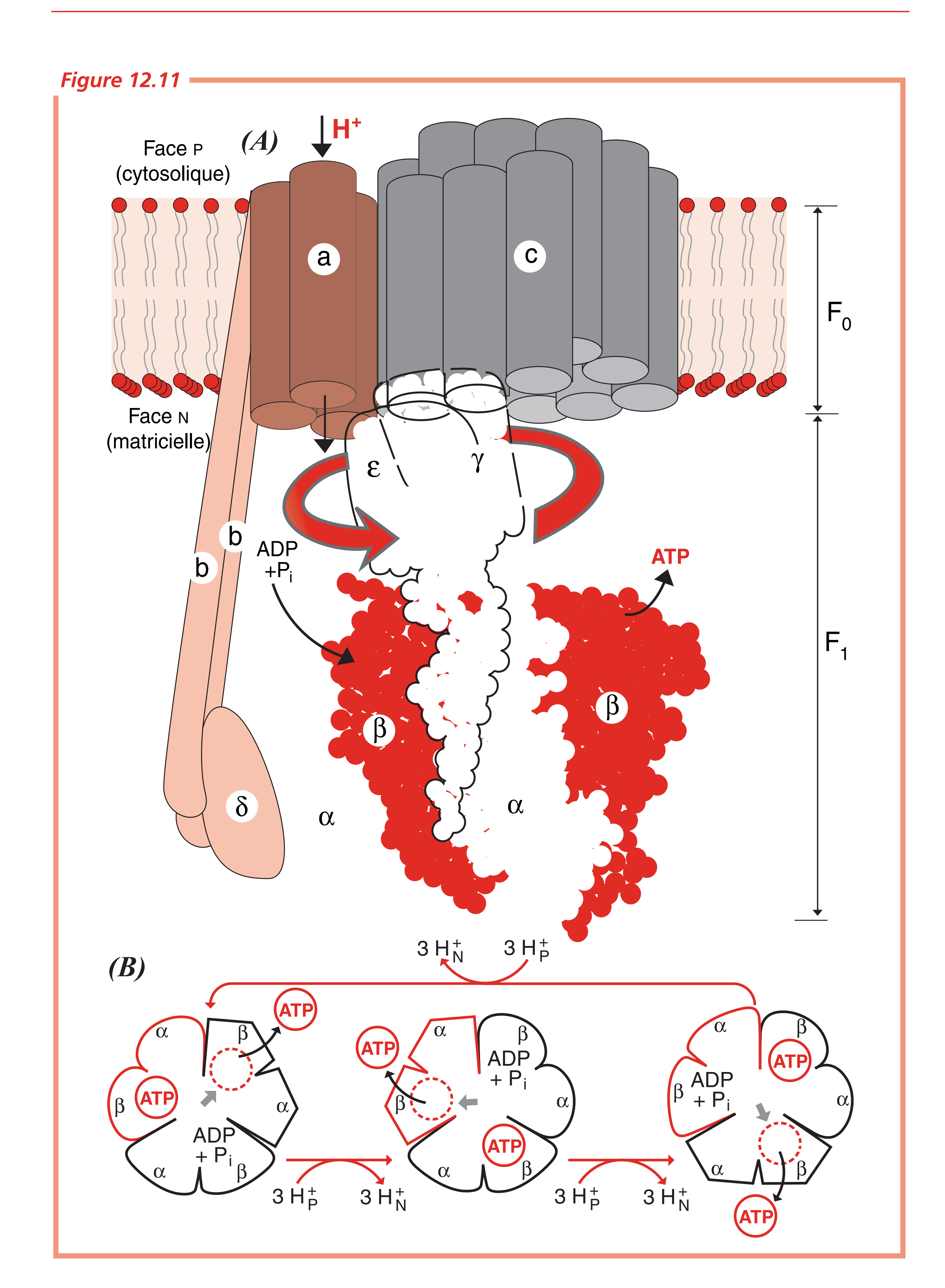
L'ATP synthase, encore appelée F_0 F_1 ATPase ou Complexe V, est un ensemble enzymatique extrêmement complexe, fonctionnellement réversible et très conservé au cours de son évolution chez les Bactéries et dans les chloroplastes et les mitochondries. L'enzyme bovin contient au moins seize protéines différentes et sa masse moléculaire est supérieure à 500 kDa. Il peut synthétiser l'ATP en utilisant une force protomotrice traversant la membrane mitochondriale interne mais aussi hydrolyser l'ATP pour pomper des protons contre un gradient électrochimique. L'ATP synthase présente deux régions, appelées F_0 et F_1, auxquelles sont dévolues des fonctions distinctes.

Les caractères essentiels de la structure de l'ATP synthase ont été déduits en partie d'études par diffraction des rayons X (*Figure 12.11A*). La région F_0 transmembranaire est constituée de trois types de sous-unités hydrophobes : **a**, **b** et **c**, avec la stœchiométrie a_1, b_2, c_{12}. La sous-unité **a** possède deux demi-canaux à protons et l'ensemble de la région F_0 forme un canal à protons qui traverse la membrane mitochondriale interne. La région F_1, située sur la face matricielle de la membrane mitochondriale interne, de forme sphérique, est constituée de cinq types de chaînes polypeptidiques, dénommées α, β, γ, δ et ε, avec la stœchiométrie $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. Les sous-unités γ et ε forment une tige centrale. Les sous-unités α et β, disposées selon un anneau hexagonal, sont homologues ; toutes deux fixent les nucléotides, mais seules les sous-unités β possèdent l'activité catalytique permettant de synthétiser l'ATP à partir d'ADP et de P_i (ou de l'hydrolyser) :

$$ADP + P_i + nH^+_p \longrightarrow ATP + H_2O + nH^+_N$$

Les sous-unités F_0 et F_1 sont connectées par la tige centrale $\gamma\varepsilon$ qui est fermement liée à l'anneau formé par les sous-unités **c** ainsi que par une colonne externe constituée de la sous-unité **a**, des deux sous-unités **b** et de la sous-unité δ.

Il y a trois sites catalytiques équivalents au sein de la région F_1 et un mécanisme catalytique propre à l'ATP synthase a été proposé (*Figure 12.11B*). À un moment donné, les trois sites catalytiques $\alpha\beta$ de l'ATP synthase sont dans une conformation différente : ouverte, lâche ou serrée, et ne sont pas fonctionnellement équivalents. Lorsque la force protomotrice active l'ATP synthase, ils passent successivement d'un état conformationnel et fonctionnel à un autre. Le site ouvert accueille les molécules d'ADP et de P_i. Le passage des protons à travers l'ATP synthase induit des changements conformationnels des trois sites. La conformation ouverte, avec son ADP et son P_i se transforme en conformation lâche. Le site en conformation lâche fixe ADP et P_i, puis devient un site serré où les deux molécules se condensent en ATP. Le site serré, qui porte alors un ATP, devient un site ouvert susceptible de libérer ce dernier et d'accueillir à nouveau ADP et P_i. Ainsi, la formation puis la libération d'ATP implique trois étapes. La liaison des substrats et la libération de l'ATP nécessitent un apport d'énergie. En revanche, lorsque les substrats sont fixés, la formation d'ATP elle-même ne nécessite pas d'énergie.


Figure 12.11
(A)
H+
Face P
(cytosolique)
Face N
(matricielle)
a
c
F0
F1
ε
γ
b
b
ADP
+Pi
ATP
β
β
δ
α
α
3 H+N
3 H+P
(B)
ATP
α
β
β
ATP
ADP
+ Pi
α
α
β
ATP
α
β
ADP
+ Pi
β
α
ATP
α
β
α
β
ATP
β
ADP
+ Pi
α
α
β
ATP
3 H+P
3 H+N
3 H+P
3 H+N

La structure tridimensionnelle de la sous-unité F_1 de l'ATP synthase bovine a révélé son asymétrie intrinsèque et des études ont suggéré que l'enzyme opère par catalyse rotationnelle, en accord avec le mécanisme proposé ci-dessus. Les sous-unités α et β sont constituées de trois domaines. Les domaines N-terminaux forment un tonneau β qui maintient la structure hexamérique $\alpha_3\beta_3$. Les interfaces des deux autres domaines accueillent les sites de liaison des nucléotides. Les domaines C-terminaux entrent en contact avec la sous-unité γ. Les sous-unités β s'ouvrent ou se ferment, par rapport aux domaines médians, grâce à leurs contacts avec la sous-unité γ dont la rotation à l'intérieur de l'hexamère $\alpha_3\beta_3$ facilite la liaison des substrats et la libération de l'ATP en modifiant les affinités de liaisons au sein des sites actifs. La rotation de la sous-unité γ est provoquée par la translocation des protons à travers la membrane mitochondriale interne.

La synthèse de l'ATP par catalyse rotationnelle nécessite donc une structure qui tourne dans la partie membranaire F_0 de l'ATP synthase, en réponse à la force protomotrice. Cette structure est un dodécamère constitué des douze sous-unités **c** qui sont associées en anneau et possèdent chacune un résidu carboxylique dont la protonation et la déprotonation alternatives sont au cœur du mécanisme rotationnel. En effet, la translocation des protons à l'interface entre les sous-unités **a** et **c** est assumée par un mécanisme de protonation d'un résidu arginine 210 de la sous-unité **a** et d'un résidu aspartate de la sous-unité **c**.

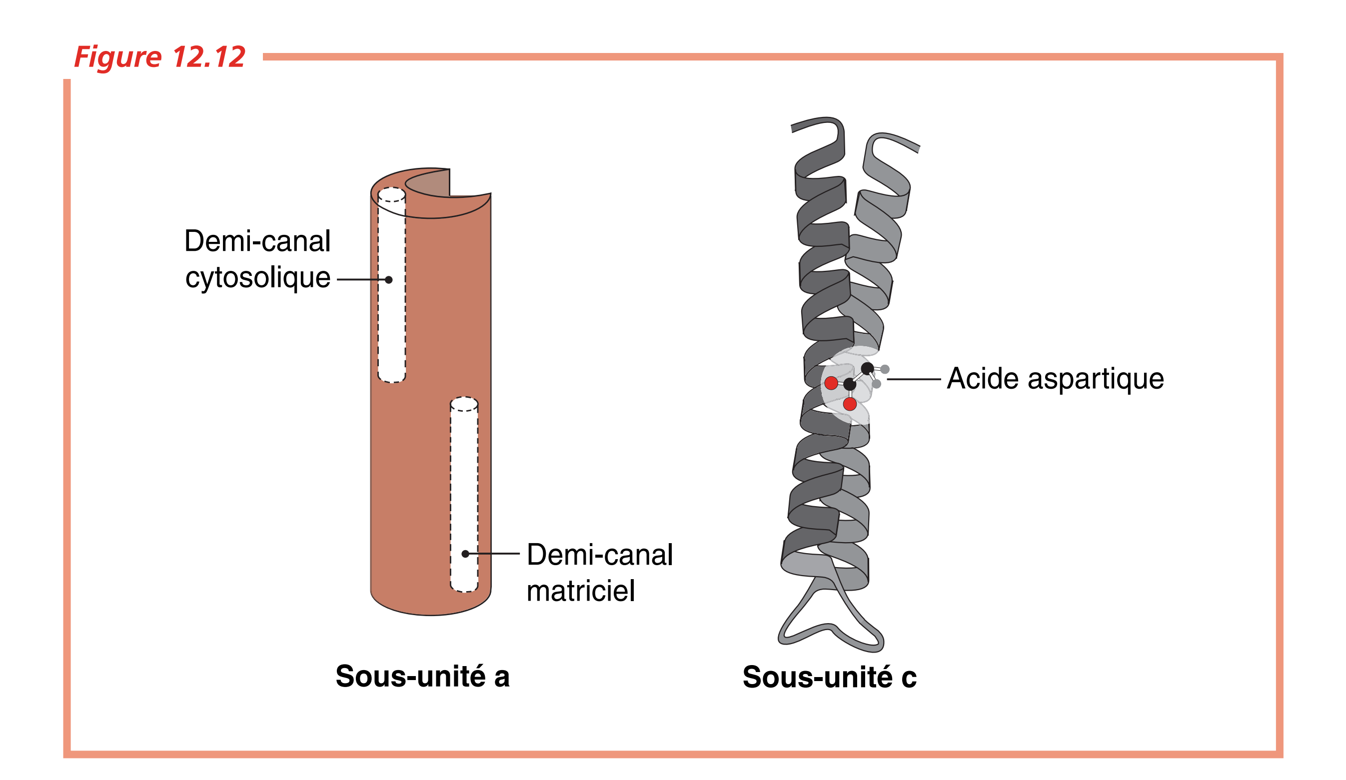
L'ATP synthase est donc formée d'un rotor constitué du dodécamère c_{12} associé aux sous-unités γ et ε et d'un stator constitué de l'hexamère $\alpha_3\beta_3$ et des sous-unités **a**, **b** et δ. Le passage des protons au niveau de l'interface entre la sous-unité **a** et le dodécamère c_{12} est à l'origine d'un couple qui permet le déplacement en sens opposé du rotor et du stator (*Figure 12.12*). Dans une telle structure, la translocation de quatre protons est nécessaire pour la synthèse d'un ATP.

BILAN DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE

L'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP par l'ATP synthase est apportée par le gradient électrochimique de protons alimenté par les complexes de la chaîne respiratoire, NADH-Q oxydoréductaséase, Q-cytochrome *c* oxydoréductase et cytochrome *c* oxydase. Ce gradient est donc un réservoir commun d'énergie utilisé par les molécules d'ATP synthase. On estime que la formation d'une molécule d'ATP à partir d'ADP et de P_i nécessite le passage de quatre protons (p. 254). Le rapport des protons transférés à l'espace intermembranaire par paire d'électrons par les différents complexes est de 4/1 pour la NADH-Q oxydoréductasease, 4/1 pour la Q-cytochrome *c* oxydoréductase et 2/1 pour la cytochrome *c* oxydase.

Ces valeurs permettent de calculer le rapport des molécules d'ADP phosphorylées par atome d'oxygène réduit, appelé rapport P/O. Lorsque le NADH mitochondrial est le substrat de la chaîne respiratoire, 10 protons sont exportés vers l'espace intermembranaire et P/O = 10/4 = 2,5. Lorsque le $FADH_2$ est le substrat, P/O = 6/4 = 1,5.

Figure 12.12


Demi-canal
cytosolique
Demi-canal
matriciel
Sous-unité a
Acide aspartique
Sous-unité c

Chapitre 13

Photosynthèse et cycle de Calvin

Dans de précédents chapitres, nous avons exposé comment Procaryotes et Eucaryotes créent l'énergie libre et le pouvoir réducteur dont ils ont besoin, sous forme d'ATP et de NADPH, respectivement, au cours de processus distincts tels que la phosphorylation au niveau du substrat, la phosphorylation oxydative et la voie des pentoses phosphate. Ce chapitre montre comment certains organismes ont acquis la faculté de biosynthétiser l'ATP et/ou le NADPH au cours de la photosynthèse, processus assumant la conversion de l'énergie solaire en énergie chimique.

La photosynthèse est l'un des processus biochimiques les plus fondamentaux et les plus anciens de la vie. Elle est apparue chez certaines Bactéries primitives, il y a plus de trois milliards d'années, puis elle s'est développée chez des Bactéries plus évoluées, les Cyanobactéries. Chez ces dernières, l'activité photosynthétique s'accompagne de la libération de O_2 dans l'environnement ; une telle activité photosynthétique est dite oxygénique. Les Algues et les plantes vertes, apparues par la suite, ont vraisemblablement intégré des Bactéries photosynthétiques dans leurs cellules. Les descendantes de ces Bactéries y ont vécu d'abord en symbiose ; elles constituent aujourd'hui les chloroplastes, organites capables d'effectuer, eux aussi, une photosynthèse oxygénique lorsque la luminosité est suffisante. Ainsi, les Cyanobactéries issues de l'évolution des Bactéries photosynthétiques primitives ont permis le développement des formes de vie aérobie, de la phosphorylation oxydative en particulier, que les Algues et les plantes vertes continuent d'entretenir.

L'ATP, le NADH et le NADPH produits lors de la phase lumineuse de la photosynthèse sont utilisés directement par les cellules photosynthétiques à des fins biosynthétiques, au cours de ce qui est parfois appelé la phase sombre de la photosynthèse, c'est-à-dire la suite des réactions qui ne nécessitent pas l'intervention de la lumière. En particulier, dans le stroma des chloroplastes des plantes vertes, l'ATP et le NADPH permettent la réduction du CO_2 en glucides ; en effet, ce dernier se retrouve dans des oses de faible masse moléculaire tels que le saccharose qui sont alors exportés dans les cellules non photosynthétiques de la plante ou mis en réserve sous forme de polysaccharides tels que l'amidon.

PHOTORÉCEPTEURS MOLÉCULAIRES

Les principaux photorécepteurs, et les plus abondants, sont les chlorophylles (*Figure 13.1A*). Ces dernières sont constituées d'un cycle porphyrinique substitué dont les atomes d'azote des quatre pyrroles sont coordonnés à un atome de magnésium. Ce cycle est apparenté à celui des hèmes (p. 134), lui aussi de nature porphyrinique, mais coordonné à un atome de fer. Une première caractéristique structurale des chlorophylles est la présence de phytol dont la fonction alcool estérifie le substituant propanoïque du cycle porphyrinique et dont la chaîne hydrocarbonée en C_{20} contribue à la nature très hydrophobe des chlorophylles. Une seconde caractéristique est la nature des autres substituants des pyrroles qui définissent les chlorophylles *a* ou *b* des Bactéries et des végétaux.

Les chlorophylles sont des polyènes dont les électrons π des doubles liaisons conjuguées sont délocalisés sur tous les atomes du cycle porphyrinique. Il en résulte que les spectres d'absorption des chlorophylles *a* et *b* des végétaux présentent des bandes dans les régions 440-480 et 640-680 nm ; dans les bactériochlorophylles, la deuxième bande est décalée vers l'infrarouge, à 870 ou à 960 nm. Les coefficients d'absorption molaires de ces bandes sont très élevés, de l'ordre de 10^5 cm^{-1} M^{-1} (*Figure 13.1B*) et ce caractère physique fait des chlorophylles de puissants photorécepteurs moléculaires dans le visible.

Lorsqu'une molécule de chlorophylle absorbe un photon, l'un de ses électrons est excité et passe sur une orbitale d'énergie supérieure. La molécule de chlorophylle excitée peut transférer l'énergie de l'électron, mais pas l'électron, sur une molécule de chlorophylle voisine par un processus d'interaction électromagnétique dit de transfert d'énergie par résonance. Elle peut aussi transférer l'électron excité lui-même sur une autre molécule de chlorophylle qui devient alors un accepteur d'électron, puis revenir à son état fondamental en captant un électron de basse énergie d'une autre molécule donneur d'électron. Ces deux mécanismes sont mis à profit lors de la photosynthèse.

Des pigments accessoires absorbant la lumière dans le milieu du visible sont présents dans les photosystèmes (*Figure 13.1C*). Ce sont soit des phéophytines, porphyrines semblables aux chlorophylles mais dépourvues de Mg^{2+}, soit des caroténoïdes, présents chez tous les phototrophes, soit des phycobilines, phycoérythrynes ou phycocyanines, rencontrées chez les Cyanobactéries et certaines Algues. Les phycobilines constituent le groupe prosthétique des phycobiliprotéines, elles-mêmes groupées dans de très gros ensembles de plusieurs millions de daltons, les phycobilisomes. Ces derniers sont fixés à la face externe de la membrane thylacoïde où ils servent d'antennes susceptibles de canaliser l'énergie lumineuse dans les centres de réaction du photosystème II.



(A)

Type de chlorophylle	R_1	R_2	R_3
Chl *a*	$-CH{=}CH_2$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$
Chl *b*	$-CH{=}CH_2$	$-C(=O)-H$	$-CH_2-CH_3$
BChl *a*	$-C(=O)-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$
BChl *b*	$-C(=O)-CH_3$	$-CH_3$	$-CH-CH_2$

$CH_2-CH{=}C(CH_3)-CH_2-[CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_2]_3-H$ Phytol (queue hydrophobe)

(B)

(C)

MEMBRANES THYLACOÏDES ET PHOTOSYSTÈMES

La photosynthèse s'effectue dans les membranes thylacoïdes des Bactéries (*Figure 13.2C*) ou des chloroplastes des plantes vertes (*Figure 13.2B*). Les membranes thylacoïdes possèdent tous les éléments nécessaires à la transduction de l'énergie : les photosystèmes et des enzymes tels que l'ATP synthase ou la ferrédoxine-NADP$^+$ réductase. Au cours de l'évolution, ces éléments ont assez largement conservé leurs structures et leurs fonctions.

Les photosystèmes (PS) sont des complexes constitués de photorécepteurs et de transporteurs d'électrons inclus dans des protéines intégrales des membranes thylacoïdes. Ils ont pour fonction de capter la lumière puis d'effectuer les premières étapes de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique.

La lumière est absorbée au niveau de complexes antenne formés de pigments, tels que les chlorophylles et les caroténoïdes, et de protéines intégrales. Son énergie est ensuite canalisée vers un centre de réaction photosynthétique constitué de chlorophylles, de transporteurs d'électrons et de protéines intégrales. Ce centre a pour fonction de réaliser une séparation transmembranaire de charges (*Figure 13.2C*). Dans un premier temps, l'énergie de la lumière permet d'exciter un électron d'un donneur d'électron primaire P, qui devient alors P* ; P (initiale de pigment) est essentiellement constitué de deux molécules de chlorophylles, ou paire spéciale qui, selon leur structure, absorbent spécifiquement certaines radiations lumineuses. Chez les Bactéries, P est localisé près de la face périplasmique du centre réactionnel ; dans les chloroplastes, il est situé près de la face luminale. L'électron excité de P* réduit un accepteur d'électron primaire A et il en résulte la formation de la paire radicalaire $P^{\bullet+}$ $A^{\bullet-}$. Dans un deuxième temps, toujours au niveau du centre de réaction photosynthétique, la rupture de la paire radicalaire $P^{\bullet+}$ $A^{\bullet-}$ conduit à une séparation transmembranaire de charges, qui est l'événement fondamental de la photosynthèse. La séparation résulte du transfert de l'électron de $A^{\bullet-}$ vers la face cytoplasmique de la membrane thylacoïde chez les Bactéries, ou stromale dans celle des chloroplastes, tandis que le cation radicalaire $P^{\bullet+}$ demeure en place. Le transfert, effectué par une chaîne de transporteurs, amène l'électron excité à un accepteur final dont la nature détermine le type du centre de réaction photosynthétique. Les centres de réaction photosynthétique, et donc les photosystèmes dont ils sont partie intégrante, sont classés en deux types. Le type II a pour accepteur terminal un composé quinonique Q, le type I une protéine fer-soufre.

Bien qu'ils soient construits selon le même principe, les photosystèmes II et I ont des structures et des fonctions propres. Au niveau du photosystème II, il y a production d'un oxydant fort, $P^{\bullet+}$, et d'un réducteur faible, QH_2. Pour assurer le retour à l'état fondamental du système, $P^{\bullet+}$ capture les électrons de divers substrats prélevés sur l'environnement, H_2S ou H_2O en autres. L'énergie de l'électron excité, qui se retrouve dans QH_2, est mise à profit pour la translocation transmembranaire vectorielle de protons conduisant à la création d'un potentiel électrochimique transmembranaire. Ce dernier permet la production d'ATP par une ATP synthase, ou photophosphorylation et, éventuellement, la réduction du NAD$^+$ par la NADH déshydrogénase.

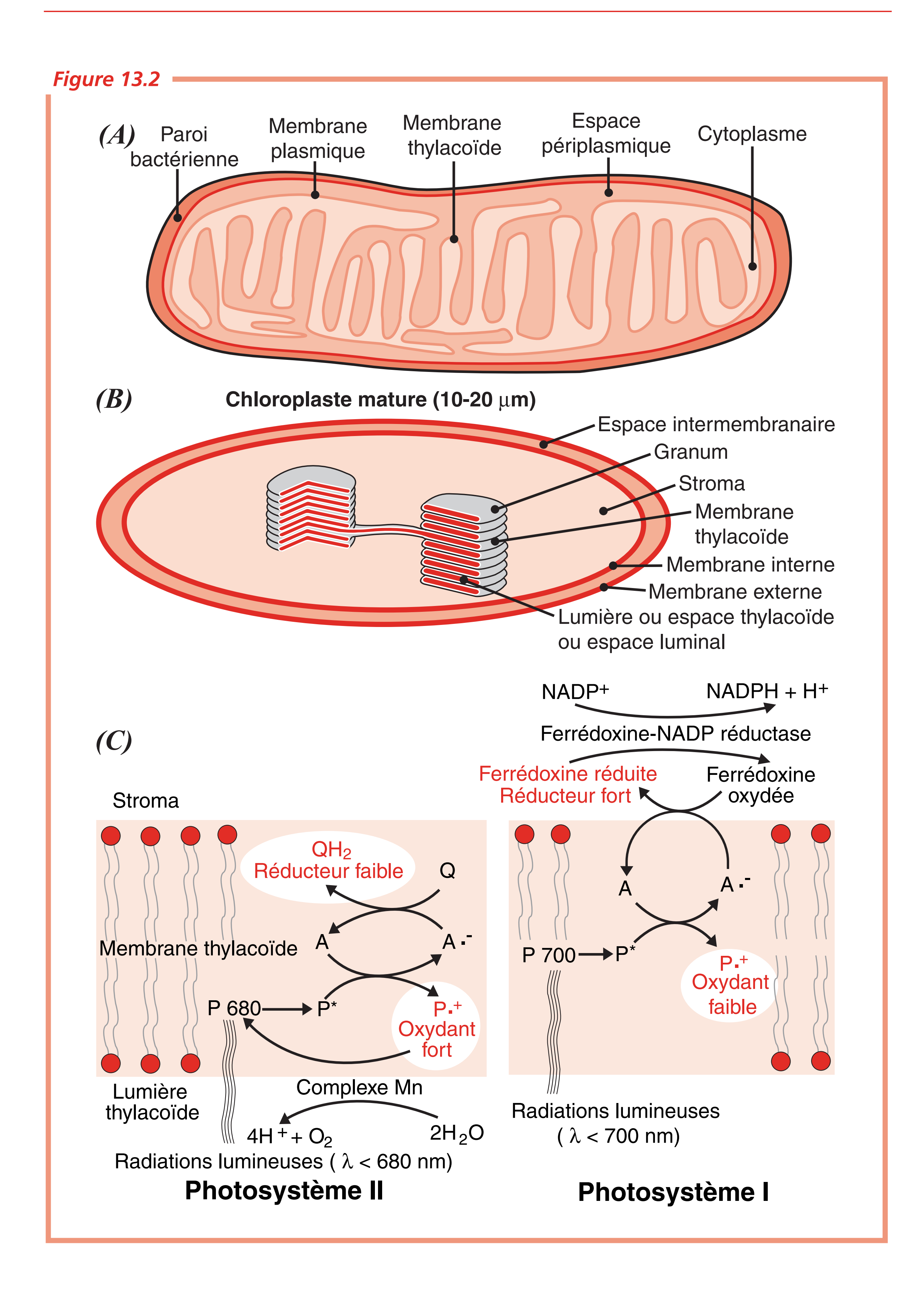


Figure 13.2
(A)
Paroi bactérienne
Membrane plasmique
Membrane thylacoïde
Espace périplasmique
Cytoplasme
(B)
Chloroplaste mature (10-20 µm)
Espace intermembranaire
Granum
Stroma
Membrane thylacoïde
Membrane interne
Membrane externe
Lumière ou espace thylacoïde ou espace luminal
(C)
NADP+
NADPH + H+
Ferrédoxine-NADP réductase
Ferrédoxine réduite
Réducteur fort
Ferrédoxine oxydée
Stroma
QH2
Réducteur faible
Q
Membrane thylacoïde
A
A·-
P 680
P*
P·+
Oxydant fort
Lumière thylacoïde
Complexe Mn
4H+ + O2
2H2O
Radiations lumineuses (λ < 680 nm)
Photosystème II
A
A·-
P 700
P*
P·+
Oxydant faible
Radiations lumineuses (λ < 700 nm)
Photosystème I

Au niveau du photosystème I, il y a production d'un oxydant faible, $P^{\bullet +}$, et d'un réducteur fort, une protéine fer-soufre réduite. Pour assurer le retour à l'état fondamental du système, $P^{\bullet +}$ capture les électrons de la plastocyanine réduite. L'énergie de l'électron excité, qui se retrouve dans la protéine fer-soufre réduite, est mise à profit pour la réduction du $NADP^+$ en NADPH.

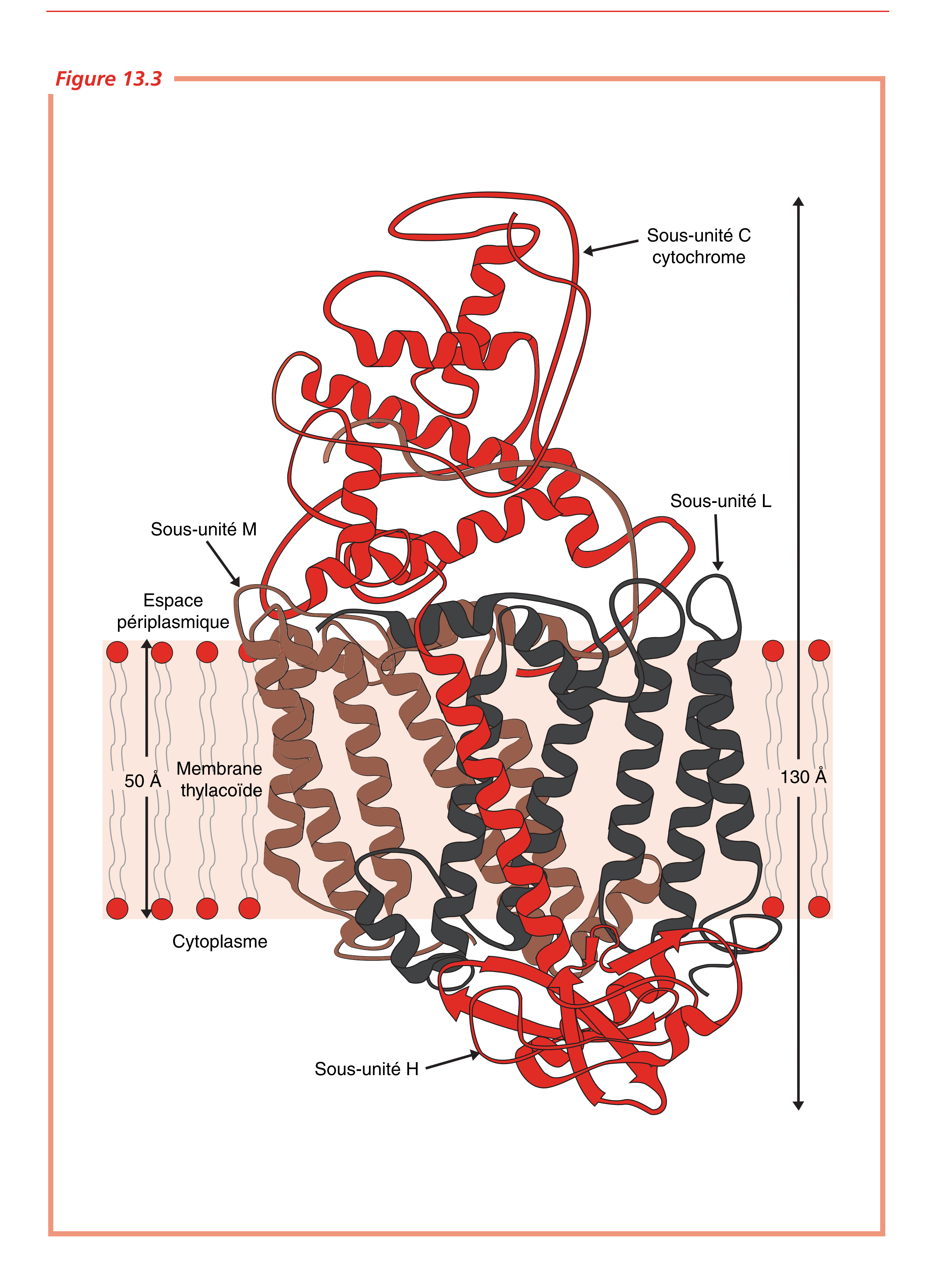
Les Bactéries pourpres et certaines Bactéries vertes possèdent un photosystème II, d'autres Bactéries vertes et les Héliobactéries un photosystème I. Les Cyanobactéries, les Algues et les plantes vertes associent en série les deux types de photosystème, selon la séquence II puis I, les deux photosystèmes étant liés par un pool de molécules de plastoquinone, le complexe du cytochrome *bf* et la plastocyanine ou le cytochrome c_6. De plus, le transfert vectoriel transmembranaire d'électrons est couplé à la création d'un potentiel électrochimique transmembranaire qui permet la synthèse d'ATP. Les produits de la photosynthèse, le NADPH et l'ATP sont utilisés lors d'une série de réactions obscures pour la réduction du CO_2 en glucides.

LE PHOTOSYSTÈME DE TYPE II DES BACTÉRIES POURPRES

Un centre de réaction photosynthétique II est localisé dans la membrane thylacoïde des Bactéries pourpres où, de concert avec le complexe du cytochrome bc_1, il crée une force protomotrice qui apporte l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase et de NADH par la NADH déshydrogénase. Le centre de réaction photosynthétique de la Bactérie pourpre *Rhodopseudomonas viridis* a été obtenu sous forme de cristaux tridimensionnels et sa structure a été déterminée par diffraction des rayons X.

Le centre de réaction photosynthétique de *Rhodopseudomonas viridis* est constitué de quatre sous-unités protéiques (*Figure 13.3*) et de 14 cofacteurs. Les quatre sous-unités sont un cytochrome de type *c* et trois sous-unités dénommées M (*medium*), L (*light*) et H (*heavy*) ; la séquence de leurs aminoacides a été déterminée à partir des séquences des gènes correspondants. Avec 336 résidus aminoacide, le cytochrome a la plus longue chaîne polypeptidique ; il est suivi par les sous-unités M (323 résidus), L (273 résidus) et H (258 résidus). Quatre des cofacteurs sont des hèmes unis par des liaisons thioéther au cytochrome. Les dix autres cofacteurs sont associés aux sous-unités L et M ; ce sont quatre bactériochlorophylles *b* (BChl *b*), deux bactériophéophytines *b* (BPh *b*), deux quinones (une ménaquinone-9 et une ubiquinone-9), un ion ferreux non héminique et un caroténoïde. Les sous-unités L et M, étroitement associées entre elles, forment, avec les bactériochlorophylles, les bactériophéophytines, les quinones, l'ion ferreux non héminique et le caroténoïde, le core du centre de réaction. Ces chaînes polypeptidiques possèdent cinq hélices transmembranaires et présentent, avec les cofacteurs qui leur sont fixés, une symétrie d'ordre 2, dont l'axe est orienté perpendiculairement au plan de la membrane. De chaque côté de la région traversant la membrane, le complexe L-M présente une surface plane parallèle à la surface de la membrane. Une sous-unité périphérique est attachée à chacune de ces surfaces : le cytochrome, avec ses quatre hèmes, sur la face périplasmique, et le domaine globulaire de la sous-unité H sur la face cytoplasmique de la membrane. La sous-unité H possède une hélice transmembranaire. Ni le cytochrome, ni la sous-unité H n'obéissent à la symétrie du core du centre de réaction.

Figure 13.3


Sous-unité C
cytochrome
Sous-unité L
Sous-unité M
Espace
périplasmique
50 Å
Membrane
thylacoïde
130 Å
Cytoplasme
Sous-unité H

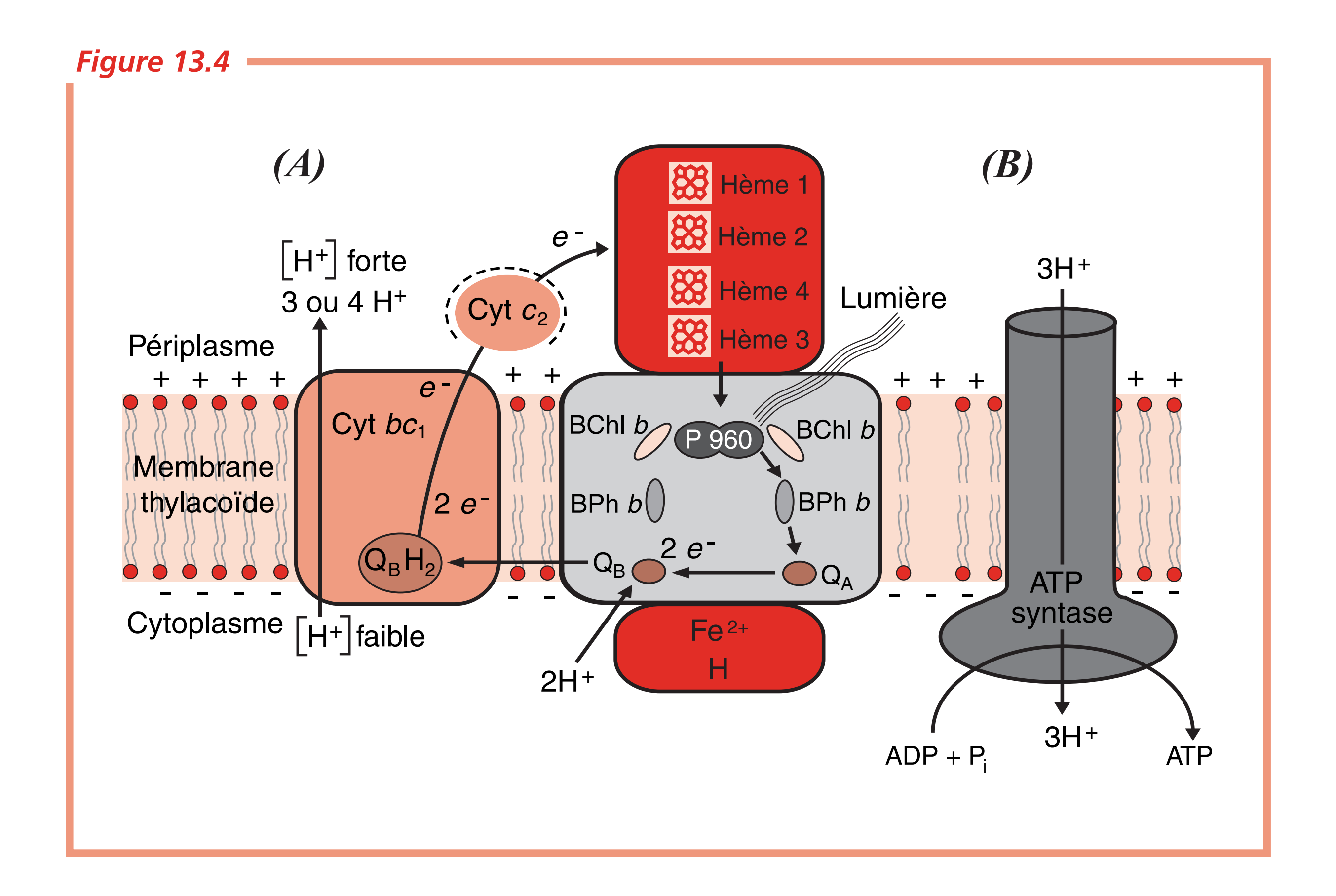
À l'exception du caroténoïde, les cofacteurs du complexe L-M sont disposés selon deux branches, appelées A et B, approximativement symétriques, contenant chacune deux BChl *b*, une BPh *b* et une quinone (*Figure 13.4A*). Ces branches ont leur origine au niveau d'une paire spéciale de BChl *b* étroitement associée, P960, localisée sur l'axe de symétrie, près de la face périplasmique de la membrane ; elles conduisent à la face cytoplasmique. L'atome de fer non héminique est situé près de la face cytoplasmique de la membrane, entre les deux quinones, près de l'axe de symétrie. Le caroténoïde est associé à la BChl *b* de la branche B.

La paire spéciale P960 est le point de départ d'une série de réactions assumant le transfert d'un électron à travers la membrane sous l'effet de la lumière. L'absorption d'un photon porte P960 au niveau de son premier état excité, P960*. À la température ambiante P960* réduit l'une des bactériophéophytines *b*, BPh *b*, en moins de 3 picosecondes. À ce stade, une séparation de charge est réalisée, avec formation de $P960^{\bullet +}$ et de BPh $b^{\bullet -}$, qui ne peuvent pas se recombiner en raison essentiellement de deux facteurs : la présence, à moins de 10 Å de BPh $b^{\bullet -}$, d'un autre accepteur d'électron, la quinone fermement liée Q_A et la présence, à moins de 10 Å de la paire spéciale, de l'un des hèmes du cytochrome qui neutralise la charge positive de cette dernière par le transfert d'un électron.

De BPh $b^{\bullet -}$, l'électron passe sur l'accepteur primaire Q_A, la ménaquinone-9, en 200 ps environ, puis sur l'accepteur secondaire Q_B, l'ubiquinone-9, en 17 à 25 ms. Les deux quinones sont situées près de la face cytoplasmique de la membrane. QB accepte deux électrons venant de deux séparations de charges successives, ainsi que deux protons venant du cytoplasme. Sous sa forme quinolique Q_BH_2, il se dissocie de son site dans le centre de réaction, où il est remplacé par une ubiquinone du pool de la membrane, puis il gagne le complexe du cytochrome bc_1 où il est oxydé. Le complexe du cytochrome bc_1 peut alors effectuer, d'une part, la translocation de 3 ou 4 protons vers l'espace périplasmique, d'autre part, transférer successivement des électrons au cytochrome du centre de réaction par l'intermédiaire du cytochrome c_2 qui est une protéine soluble du périplasme. Ces électrons sont utilisés pour la réduction du donneur primaire d'électron oxydé $P960^{\bullet +}$. Ainsi, chez *Rhodopseudomonas viridis*, lors du processus photosynthétique primaire, la lumière apporte l'énergie nécessaire à un transport cyclique d'électron qui crée et maintient un gradient électrochimique de protons à travers la membrane. Ce gradient fournit l'énergie qui assume la photophosphorylation de l'ADP en ATP par l'ATP synthase (*Figure 13.4B*) ou la réduction du NAD^+ par une NADH déshydrogénase. Il permet aussi le transport d'ions ou de molécules à travers la membrane contre un gradient de concentration.

Les réactions conduisant à un transfert d'électron au sein du centre de réaction ont plusieurs propriétés remarquables. Ainsi, une seule des deux branches de cofacteurs est utilisée, ce qui soulève des problèmes concernant la fonction et l'évolution de ces branches. De même, le rôle de la BChl *b* accessoire, qui pourrait être le premier accepteur d'électron, est encore en discussion. Par ailleurs, certains centres de réaction de Bactéries pourpres photosynthétiques autres que *Rhodopseudomonas viridis* n'ont pas de cytochrome ; d'autres possèdent BChl *a* et BPh *a* au lieu de BChl *b* et BPh *b*. Néanmoins, en raison des grandes analogies des séquences de leurs protéines constitutives, les structures de ces centres de réaction doivent être très semblables.

Figure 13.4



PHOTOSYSTÈME I DES CYANOBACTÉRIES

Un photosystème I (PS I) est localisé dans la membrane thylacoïde des Cyanobactéries où, de concert avec un photosystème II (PS II), il apporte l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP par une ATP synthase et de NADPH par la ferrédoxine-NADP$^+$ réductase.

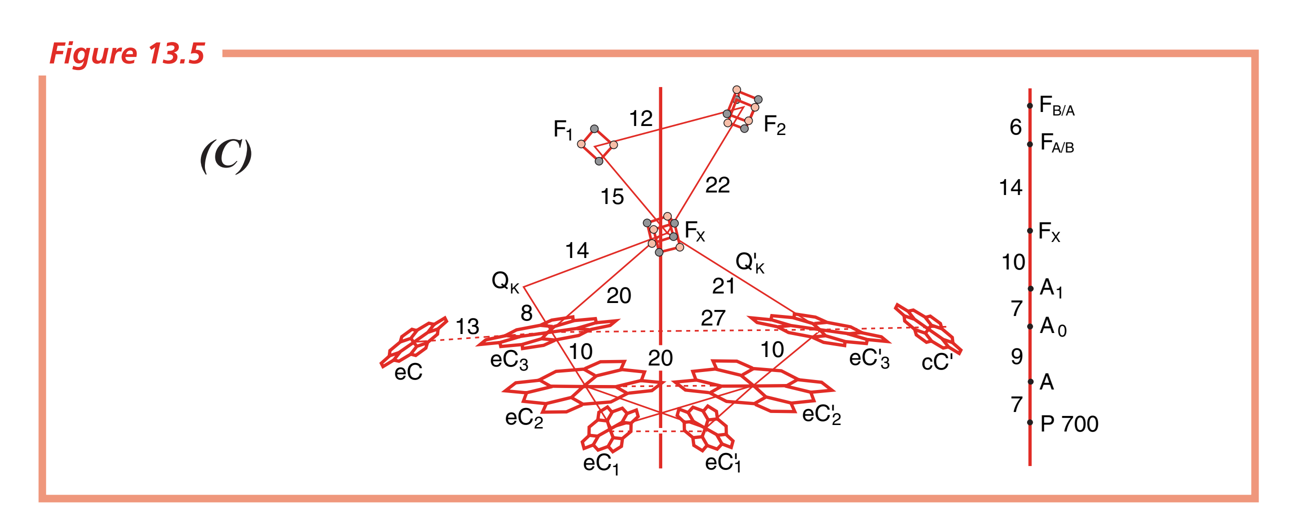
Le PS I de *Synechococcus elongatus* est un trimère en forme de disque, d'environ 105 Å de rayon et de 90 Å d'épaisseur, présentant un axe de symétrie d'ordre 3 (C3), perpendiculaire au plan de la membrane thylacoïde. Chaque monomère (*Figure 13.5A*) est constitué de onze sous-unités, dénommées PsaA à PsaF et PsaI à PsaM, en accord avec les noms de leurs gènes. Les deux plus grosses sous-unités, PsaA et PsaB, sont le siège du centre de réaction photosynthétique et fixent la plupart des quelques 100 molécules de Chl *a* du complexe antenne, les 15 à 20 molécules de caroténoïdes, ainsi que la plupart des cofacteurs du système de transport des électrons. Ces cofacteurs sont le donneur primaire d'électron P700, un dimère de Chl *a*, l'accepteur primaire d'électron A_0, un monomère de Chl *a*, le deuxième accepteur d'électron A_1, une phylloquinone, et F_X, un groupe 4Fe-4S. La sous-unité extrinsèque PsaC fixe les deux cofacteurs terminaux de la chaîne de transport des électrons, les centres 4Fe-4S, dénommés F_A et F_B. Les sous-unités PsaC, PsaD et PsaE font saillie sur la face stromale (cytoplasmique) où elles forment une crête, la face luminale (périplasmique) étant essentiellement plane.

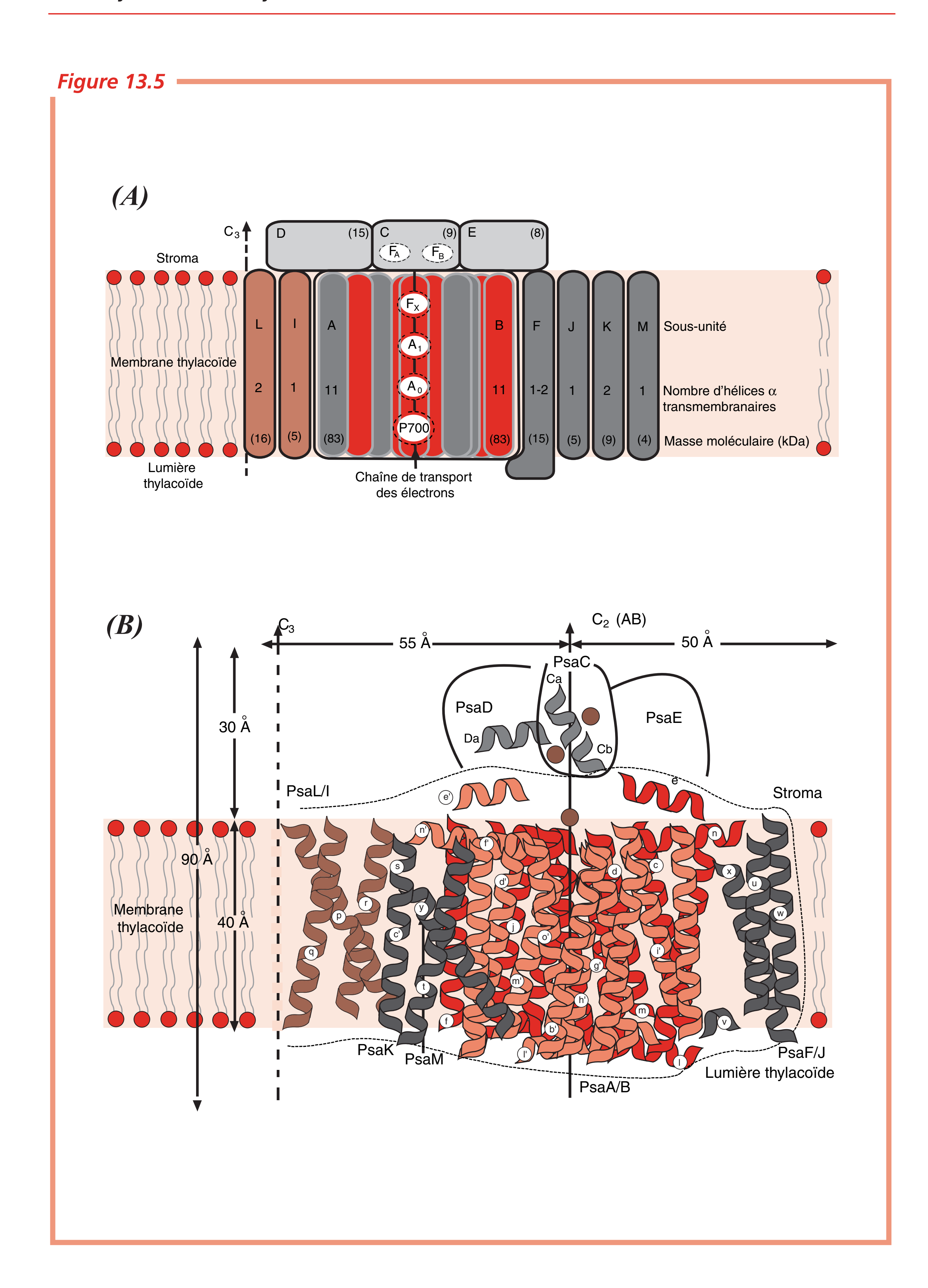
Chaque monomère de PS I possède quarante-trois hélices α (*Figure 13.5B*). Trente d'entre elles appartenant aux hélices PsaA (a à o) et PsaB (a' à o') sont approximativement symétriques par rapport à un pseudo-axe de symétrie C2(AB), perpendiculaire au plan de la membrane thylacoïde, passant par le centre de F_X. Dans chaque sous-unité PsaA ou PsaB, onze hélices sont transmembranaires, une luminale et trois stromales. Cinq des onze hélices transmembranaires de chaque sous-unité PsaA ou PsaB forment une région centrale où sont logés les cofacteurs de la chaîne de transport des électrons, de P700 à F_X ; ces derniers sont ainsi spatialement séparés des Chl *a* antenne et géométriquement maintenus dans une position correcte pour l'accomplissement de leur fonction. Parmi les treize hélices restantes, C*a*, C*b* et D*a* sont dans la crête stromale ; *p* à *y* appartiennent aux sous-unités PsaF, PsaI, PsaJ et PsaM ; *p* à *u* et *w* à *y* sont des hélices transmembranaires et *v* une hélice de surface.

D'un point de vue global, le PS I des Cyanobactéries peut être considéré comme une oxydoréductase, activée par la lumière, qui oxyde la plastocyanine et/ou le cytochrome c_6, tandis qu'elle réduit la ferrédoxine et/ou la flavodoxine. Au niveau moléculaire, PS I réalise cette oxydoréduction au moyen d'une séparation de charge transmembranaire dont l'énergie est apportée par la lumière. Cette séparation s'effectue tout au long d'un groupe de cofacteurs disposés de façon à former une chaîne de transport d'électrons qui traverse la membrane thylacoïde (*Figure 13.5C*). À la suite de l'excitation du donneur primaire d'électron P700 par l'énergie fournie par le complexe antenne, la séparation de charge est réalisée par la formation d'une première paire radicalaire $P700^{\bullet+}$ A_0^- en 2 à 4 ps. P700 est un dimère de Chl *a*, A_0 un monomère de Chl *a*. Cette première paire d'ions radicalaires est rapidement stabilisée par la réoxydation de A_0^- par A_1, en 20 à 50 ps. A_1^-, le second accepteur, est une molécule de phylloquinone. Dans les 200 ns qui suivent, l'état semi-stable $P700^{\bullet+}$ A_1^- conduit à la réduction de F_X, qui est constitué par un groupe 4Fe-4S lié à PsaA et PsaB. Ce dernier est réoxydé par F_A ou F_B, liés à PsaC, qui, enfin, réduisent la ferrédoxine en moins de 100 ms. Pour sa part, $P700^{\bullet+}$ est réduit par la plastocyanine, protéine soluble contenant du cuivre, et/ou le cytochrome c_6. La région abritant les cofacteurs de la chaîne de transport des électrons se situe à l'intérieur de la palissade formée par les dix hélices les plus internes groupées autour du pseudo-axe C2(AB). À l'exception de F_A et F_B, les cofacteurs sont disposés sur deux branches pseudo-symétriques.

Le PS I des Cyanobactéries contient enfin un complexe antenne intégral formé d'une centaine de molécules de Chl *a*, connecté au centre de réaction photosynthétique.

Figure 13.5




Figure 13.5
(A)
C3
Stroma
D (15)
C (9)
E (8)
FA
FB
FX
A1
A0
P700
L
I
A
B
F
J
K
M
Sous-unité
Membrane thylacoïde
2
1
11
11
1-2
1
2
1
Nombre d'hélices α transmembranaires
(16)
(5)
(83)
(83)
(15)
(5)
(9)
(4)
Masse moléculaire (kDa)
Lumière thylacoïde
Chaîne de transport des électrons
(B)
C3
C2 (AB)
55 Å
50 Å
PsaC
Ca
PsaD
Da
Cb
PsaE
30 Å
PsaL/I
Stroma
90 Å
Membrane thylacoïde
40 Å
PsaK
PsaM
PsaA/B
PsaF/J
Lumière thylacoïde

PHOTOSYSTÈME II DES CHLOROPLASTES

Le photosystème II (PS II) des chloroplastes est un complexe de protéines membranaires thylacoïdes multisous-unitaire qui catalyse le transfert d'électrons de l'eau à la plastoquinone Q elle-même réduite en plastoquinol QH2 (*Figure 13.6A*).

Ce transfert est thermodynamiquement défavorable et ne peut être effectué que grâce à l'apport énergétique de la lumière.

Le PS II natif, d'une masse moléculaire supérieure à 600 kDa, contient au moins 25 sous-unités différentes. Les protéines transmembranaires D1 et D2, de masse moléculaire 32 kDa, forment le centre de réaction photosynthétique (*Figure 13.6B*). Par leur structure et leur fonction, ces protéines sont apparentées aux sous-unités L et M du centre de réaction photosynthétique des Bactéries pourpres. Elles contiennent la chaîne de transfert des électrons. Cette dernière est constituée de plusieurs transporteurs : une paire de chlorophylle P680 qui, par l'action de la lumière, peut être portée à l'état excité P680* ; une phéophytine qui est une molécule de chlorophylle a sans magnésium ; une plastoquinone Q_A et une plastoquinone Q_B qui réalisent le transfert de charges. Deux photons sont nécessaires pour réduire une molécule de plastoquinone Q en plastoquinol QH_2. Les électrons de ce dernier pourront être transférés au photosystème I.

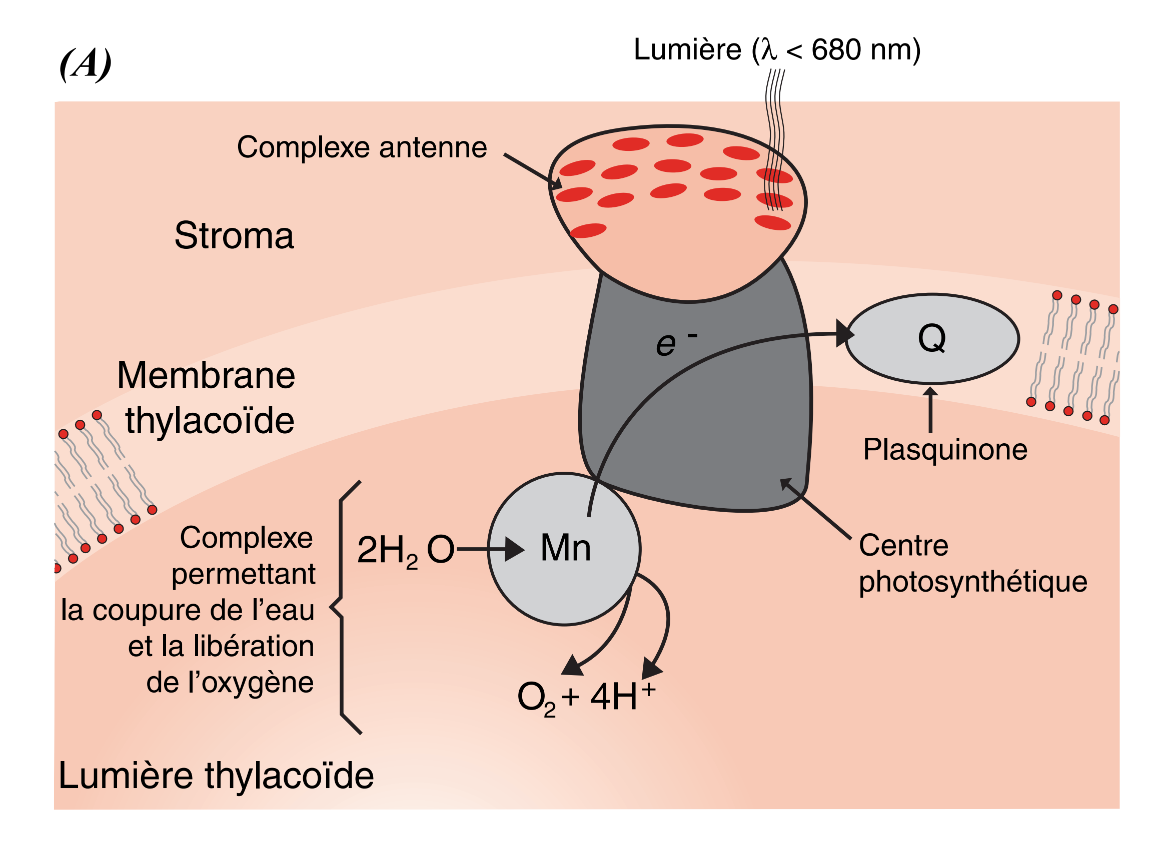
Les protéines CP43 et CP47, étroitement associées aux protéines D1 et D2, sont capables de fixer des molécules de chlorophylle pour constituer une antenne interne. De plus, avec une protéine périphérique de 33 kDa, quelques autres protéines périphériques de faible masse moléculaire et un groupe de quatre atomes de manganèse, elles participent à la formation du complexe qui permet la réduction du $P680^{\bullet+}$ formé lors de la première étape de la séparation de charge. $P680^{\bullet+}$ est un oxydant fort et sa réduction est assumée par l'extraction des électrons d'une molécule d'eau dont l'oxygène O_2 est libéré.

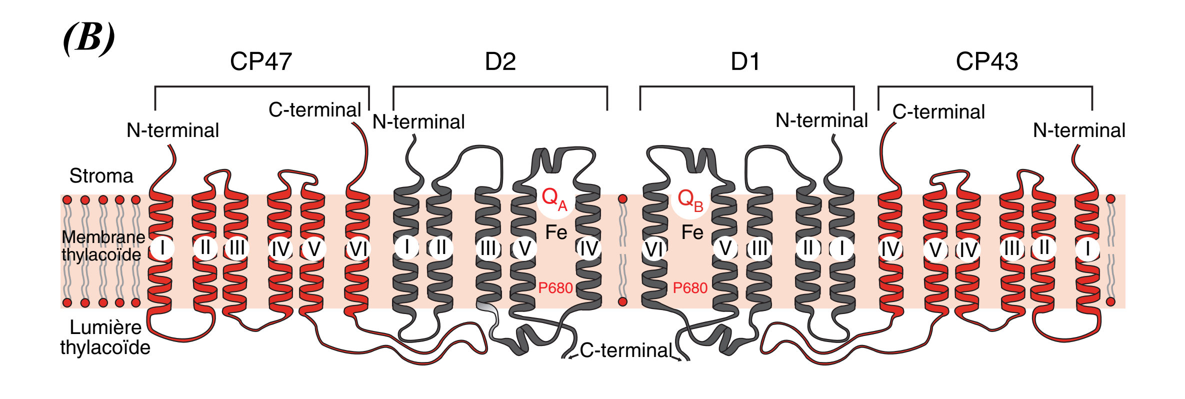
Enfin, le PS II est associé à une protéine de 26 kDa qui fixe sept molécules de chlorophylle *a*, six molécules de chlorophylle *b* et deux caroténoïdes pour former une antenne externe dénommée LHC-II (de *light-harvesting complex*) ; LHC-II est la protéine membranaire la plus abondante des chloroplastes.

Le bilan des réactions effectuées par le photosystème II s'établit ainsi :

$$2Q + 2H_2O \xrightarrow{\text{Énergie lumineuse}} O_2 + 2QH_2$$

Figure 13.6


Photosystème II
(A)
Lumière (λ < 680 nm)
Complexe antenne
Stroma
Membrane thylacoïde
e⁻
Q
Plasquinone
Complexe permettant la coupure de l'eau et la libération de l'oxygène
2H₂O
Mn
O₂ + 4H⁺
Centre photosynthétique
Lumière thylacoïde


(B)
CP47
D2
D1
CP43
N-terminal
C-terminal
N-terminal
N-terminal
C-terminal
N-terminal
Stroma
Membrane thylacoïde
Lumière thylacoïde
QA
QB
Fe
Fe
P680
P680
C-terminal
I
II
III
IV
V
VI

COUPLAGE DU PHOTOSYSTÈME II AU PHOTOSYSTÈME I

Le photosystème II est couplé au photosystème I par le complexe du cytochrome *bf*, dénommé aussi cytochrome b_6f, et par la plastocyanine (*Figure 13.7*). Le complexe du cytochrome *bf* est formé de quatre sous-unités : le cytochrome *f*, le cytochrome *b*563, qui contient deux hèmes, une protéine fer-soufre de type Rieske et une chaîne polypeptidique de 17 kDa. Il assume le transfert des électrons du plastoquinol QH_2 à la plastocyanine et le pompage simultané de protons du stroma vers la lumière thylacoïde, à travers la membrane thylacoïde. Sa structure et sa fonction sont semblables à celles de la Q-cytochrome *c* oxydoréductase mitochondriale (p. 248). Le complexe catalyse la réaction par l'intermédiaire du cycle Q. Dans la première partie de ce dernier, le plastoquinol est oxydé en plastoquinone, un électron après l'autre. Les électrons du plastoquinol passent par la protéine fer-soufre pour convertir la plastocyanine oxydée en sa forme réduite.

La plastocyanine (*Figure 13.7*) est une protéine périphérique mobile de 11 kDa dont le centre d'oxydoréduction est formé par un ion cuivre coordonné à quatre résidus aminoacide : deux histidines et deux chaînes latérales contenant un atome de soufre, une méthionine et une cystéine. L'ion cuivre cycle entre les états d'oxydation + 1 et + 2.

Le bilan des réactions effectuées par le complexe du cytochrome *bf* et la plastocyanine s'établit ainsi :

$$QH_2 + 2Cu^{2+}\text{(plastocyanine)} \xrightarrow{\text{Énergie lumineuse}} Q + 2Cu^{+}\text{(plastocyanine)} + 2H^{+}\text{ (lumière thylacoïde)}$$

PHOTOSYSTÈME I DES CHLOROPLASTES

Le photosystème I (PS I) des chloroplastes est un complexe de protéines membranaires thylacoïdes multisous-unitaire d'une masse moléculaire supérieure à 800 kDa, qui contient au moins 13 sous-unités différentes (*Figure 13.8A*). Il est très semblable au photosystème I des Cyanobactéries décrit précédemment. Le centre de réaction photosynthétique est formé par deux protéines transmembranaires très semblables PsaA et PsaB (*Figure 13.8B*), d'une masse moléculaire de 83 et 82 kDa, respectivement. L'énergie lumineuse est transférée du complexe antenne à une paire de chlorophylles *a* P700 qui passe à l'état activé P700*. Pour réaliser la séparation de charges, un électron est transféré de P700* à une chlorophylle A_0 pour donner $P700^{\bullet+}$ et $A_0^{\bullet-}$. Ce dernier est un réducteur très puissant ($E°' = -1{,}1$ V) dont le potentiel est transféré, à travers une quinone A_1 et une protéine 4Fe-4S F_X, à la ferrédoxine, protéine périphérique de 12 kDa de la face stromale de la membrane thylacoïde, contenant un groupe 2Fe-2S coordonné à la cystéine.

Figure 13.7

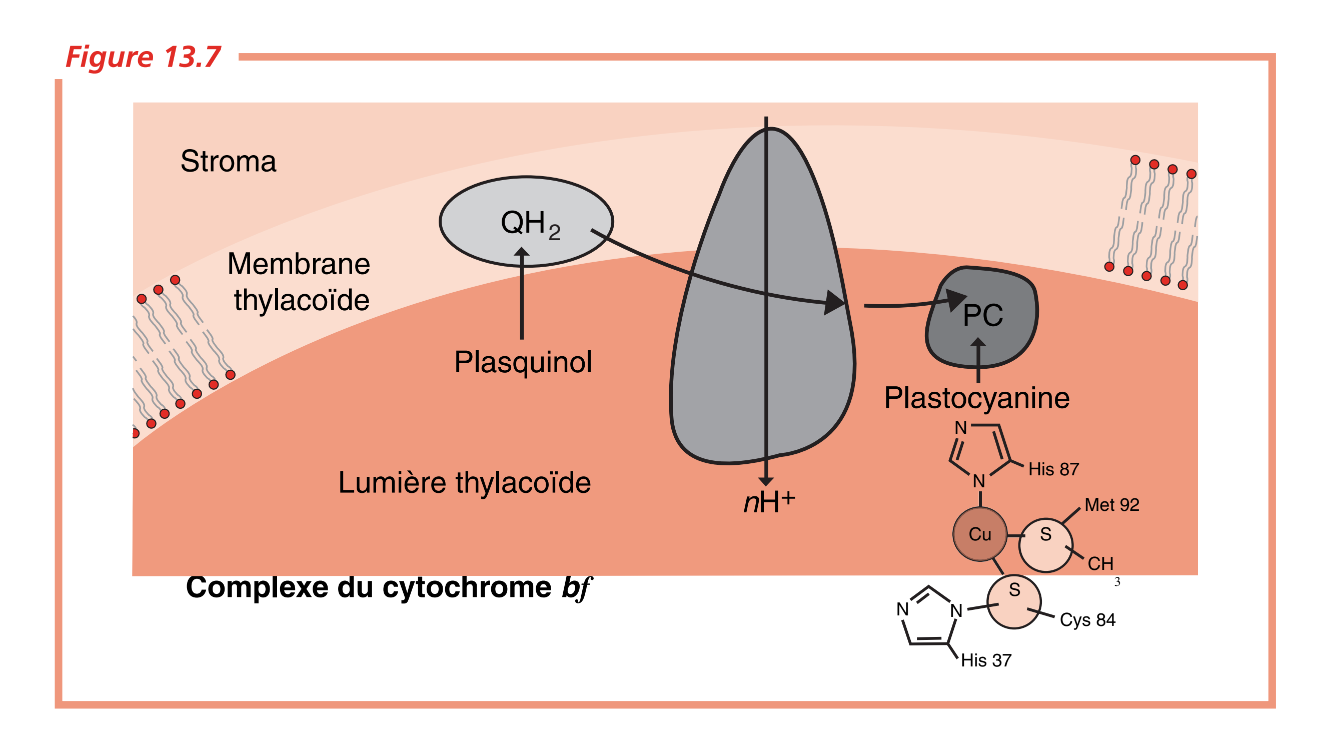


Figure 13.8

Lumière (λ < 700 nm)
Photosystème I
(A)
Complexe antenne
Ferrédoxine
Stroma
NADP+
NADPH
4Fe-4S
Quinone (A_1)
Chlorophille (A_0)
P700
e-
e-
Membrane thylacoïde
Ferrédoxine-NADP+ réductase
Plastocyanine
Lumière thylacoïde
(B)
PsaA
PsaB
Vers l'extrémité N-terminale
Vers l'extrémité N-terminale
Stroma
Membrane thylacoïde
Lumière thylacoïde
a b c d e f g h i j k o n m
P700
P700
m n o k j i h g d e f c b a
Vers l'extrémité C-terminale

Les électrons à haut potentiel de deux molécules de ferrédoxine sont finalement transférés à $NADP^+$ pour former NADPH, au cours d'une réaction catalysée par la ferrédoxine-$NADP^+$ réductase. Par ailleurs, $P700^{\bullet+}$ capte un électron de la plastocyanine réduite pour revenir à l'état P700.

Le bilan des réactions effectuées par le photosystème I s'établit ainsi :

$$Pc\,(Cu^+) + Fd_{ox} \xrightarrow{\text{Énergie lumineuse}} Pc\,(Cu^{2+}) + Fd_{red}$$

FERRÉDOXINE ET NADPH

La ferrédoxine réduite n'est pas directement utilisable comme réducteur dans les réactions de biosynthèse parce qu'elle ne transporte qu'un électron. En revanche, elle peut être utilisée pour réduire le $NADP^+$ en NADPH dans une réaction catalysée par la ferrédoxine-$NADP^+$ réductase qui est une flavoprotéine dont le FAD accepte les électrons un par un. Lorsque le coenzyme est réduit, l'enzyme transfert un ion hydrure au $NADP^+$ pour former le NADPH (*Figure 13.9*).

GRADIENT DE PROTONS, ATP SYNTHASE ET PHOTOPHOSPHORYLATION

Au cours de la photosynthèse dans les chloroplastes, des protons sont émis dans la lumière thylacoïde où ils s'accumulent car la membrane thylacoïde est une barrière de perméabilité. Le gradient de pH entre la lumière thylacoïde, où le pH est d'environ 5, et le stroma, où le pH est d'environ 8, résulte de l'activité des trois complexes (*Figure 13.10*).

Le photosystème II libère les protons de l'eau dans la lumière thylacoïde. Le complexe du cytochrome *bf* pompe des protons du stroma vers la lumière thylacoïde. Le photosystème I utilise des protons du stroma pour former le NADPH. Le gradient de 3 unités pH représente une force protomotrice de 200 mV environ.

Une ATP synthase est localisée dans la membrane thylacoïde. Avec ses deux parties dénommées CF_0 et CF_1, elle est très semblable à celle de la membrane mitochondriale (p. 254). CF_1, qui apparaît sur la face stromale, met à profit l'énergie du flux de protons à travers CF_0, dans le sens du gradient de concentration, de l'espace luminal vers le stroma, pour synthétiser l'ATP à partir de l'ADP et du P_i. Cet important processus est dénommé photophosphorylation.

Figure 13.9

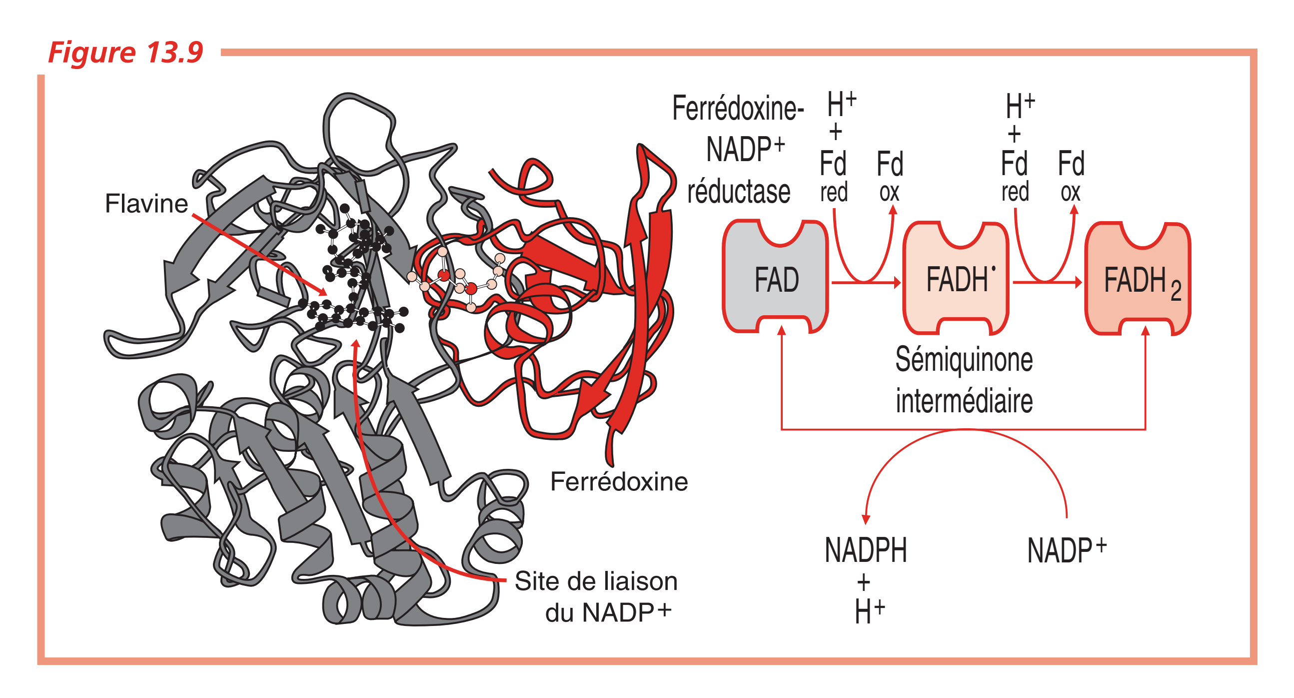


Figure 13.10

Photosystème II
Photosystème I
Potentiel d'oxydoréduction (V)
– 1,4
– 1,2
– 1,0
– 0,8
– 0,6
– 0,4
– 0,2
0
0,2
0,4
0,6
0,8
P700
A_0
A_1
F_X
Ferrédoxine
Ferrédoxine
NAD+-réductase
NADP+
+
Gradient
de protons
Photon 2
Énergie
lumineuse
P680*
Phéophytine
Photon 1
Plastoquinone Q_A
Plastoquinone Q_B
Énergie
lumineuse
Plastoquinone réduite QH_2
Complexe
du cytochrome
bf
P700
Gradient
de protons
Plastocyanine
H_2O
Groupe
Mn
P680
O_2 + Gradient de protons

CONVERSION DU CO_2 EN POLYSACCHARIDES

L'ATP et le NADPH, produits des réactions photosynthétiques de transfert d'électrons, représentent la source d'énergie et de pouvoir réducteur nécessaires aux réactions de fixation du carbone. Ces réactions sont souvent dénommées réactions obscures de la photosynthèse, car elles ne nécessitent pas l'intervention de la lumière, ou encore cycle de Calvin. Elles commencent dans les chloroplastes, se poursuivent dans le cytoplasme et aboutissent à la synthèse de saccharose et d'amidon dans les feuilles des plantes vertes.

La réaction cruciale de la fixation du carbone est la combinaison du CO_2 avec le ribulose 1,5-bisphosphate et la formation de deux molécules de 3-phosphoglycérate (*Figure 13.11A*). La réaction, catalysée par la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase, souvent appelée rubisco, localisée sur la face stromale des membranes thylacoïdes des chloroplastes, est très exergonique ($\Delta G°' = -51,9$ kJ mol^{-1}) car le ribulose 1,5-bisphosphate réagit sous la forme d'un ènediol intermédiaire. Rubisco, qui représente 50 % des protéines des chloroplastes, est l'enzyme le plus abondant de la Terre. D'une masse moléculaire supérieure à 500 kDa, il est constitué par huit copies de deux sous-unités, L (de *large*), de 55 kDa, et S (de *small*), de 13 kDa, dont l'une est codée par le DNA des chloroplastes et l'autre par le DNA nucléaire. Chaque chaîne L contient un site catalytique et un site régulateur. Les chaînes S augmentent l'activité catalytique des chaînes L. La structure tridimensionnelle de rubisco a été déterminée à haute résolution et a montré que son site actif était situé sur des boucles d'un tonneau αβ. Rubisco nécessite la présence d'un ion métallique divalent, habituellement l'ion Mg^{2+}, pour être active.

L'ATP et le NADPH interviennent dans la fixation du CO_2 lors du cycle de Calvin (*Figure 13.11B*) où le 3-phosphoglycérate formé par rubisco est transformé en hexoses phosphate, puis en di- et polysaccharides. Le cycle de Calvin présente trois phases : la fixation du carbone par la carboxylation du ribulose 1,5-bisphosphate, la réduction du carbone fixé afin d'initier la synthèse d'un hexose puis la régénération du ribulose 1,5-bisphosphate. Les étapes de la deuxième phase sont identiques à celles de la voie de la gluconéogenèse, à ceci près que la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase des chloroplastes est spécifique du NADPH et non pas du NADH. Les étapes de la troisième phase forment un ose à cinq carbones à partir d'oses à six ou à trois carbones au cours d'un ensemble complexe de réactions qui font intervenir des enzymes tels que la transcétolase et la transaldolase. Au total, trois molécules d'ATP et deux molécules de NADPH sont nécessaires pour la fixation d'une molécule de CO_2.

L'équation traduisant le cycle de Calvin s'écrit :

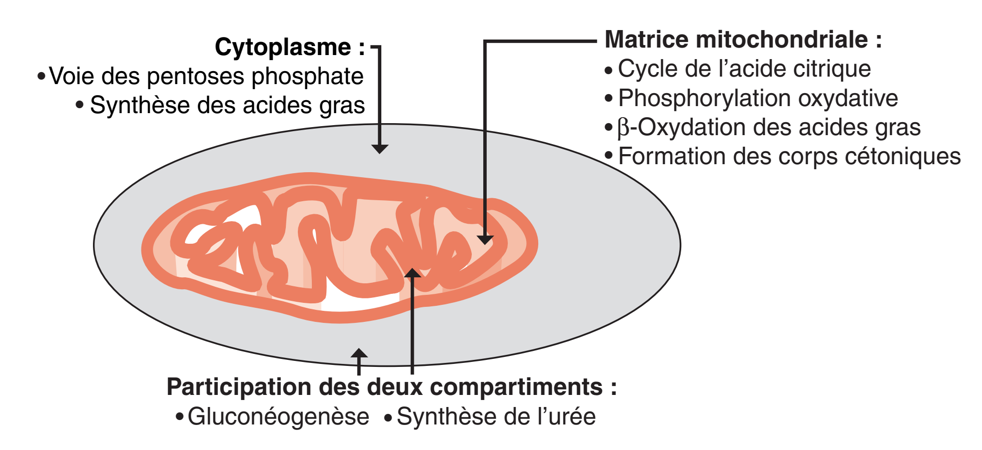
$$6\ CO_2 + 18\ ATP + 12\ NADPH + 12\ H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 18\ ADP + 18\ P_i + 12\ NADP^+ + 6\ H^+$$


Figure 13.11
(A)
$CH_2OPO_3^{2-}$
Glu
Asp
Mg^{2+}
Lys
C=O
H—C—O
H
H—C—OH
$CH_2OPO_3^{2-}$
Ribulose 1,5-bisphosphate
$CH_2OPO_3^{2-}$
C—OH
C—OH
—C—OH
$CH_2OPO_3^{2-}$
Énediol intermédiaire
CO_2
H^+
$CH_2OPO_3^{2-}$
HO—C—COO^-
C=O
H—C—OH
$CH_2OPO_3^{2-}$
Intermédiaire lié à l'enzyme
$+H_2O$
$CH_2OPO_3^{2-}$
H—C—OH
COO^-
3-Phosphoglycérate
COO^-
H—C—OH
$CH_2OPO_3^{2-}$
3-Phosphoglycérate
(B)
CO_2
Fixation
Rubisco
3-Phosphoglycérate
ATP
ADP
Ribulose 1,5-bisphosphate
1,3-Bisphosphoglycérate
ADP
ATP
Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
NADPH
$NADP^+$
Ribulose 5-phosphate
Glycéraldéhyde 3-phosphate
Régénération
Réduction
Glycéraldéhyde 3-phosphate
Glycéraldéhyde 3-phosphate
Fructose 1-6-bisphosphate
Fructose 6-phosphate
Glucose 6-phosphate
Glucose 1-phosphate
Pool des hexoses monophosphate
Stroma
Cytoplasme
Di-et polysaccharides

Chapitre 14

Intégration et régulation du métabolisme énergétique

Dans les chapitres précédents, les principales voies métaboliques des glucides, des lipides et des aminoacides ont été exposées, essentiellement d'un point de vue analytique. Dans l'immense majorité des systèmes vivants, et en particulier chez les Mammifères principalement considérés ici, les voies de synthèse et de dégradation sont distinctes. Dans les cellules eucaryotes, les diverses voies métaboliques s'effectuent dans des compartiments délimités, essentiellement le cytoplasme et les mitochondries. Elles permettent de créer les molécules simples, l'énergie chimique sous forme d'ATP ou de GTP et le pouvoir réducteur sous forme de NADPH, tous éléments nécessaires à la synthèse des biomolécules polymériques telles que les protéines, les acides nucléiques, les lipides complexes, les polysaccharides.



Pour pouvoir participer aux manifestations de la vie végétative et de la vie de relation, les voies métaboliques doivent être interconnectées. Des interconversions de métabolites sont possibles et chaque voie fonctionne en coopération et en coordination avec les autres afin de réaliser au mieux l'équilibre indispensable au fonctionnement harmonieux des divers organes constitutifs d'un être vivant. Une telle interconnexion est réalisée essentiellement grâce à des carrefours métaboliques clé, tels que le glucose 6-phosphate, le pyruvate et l'acétyl CoA.

De plus, l'anabolisme et le catabolisme sont coordonnés par des interactions allostériques, par modification covalente, par le contrôle du taux des enzymes, par la compartimentation cellulaire et par la spécialisation des organes.

Enfin, des signaux hormonaux participent à l'adaptation de la concentration et du métabolisme des molécules énergétiques aux besoins physiologiques instantanés des organismes.

INTERCONVERSION DES MÉTABOLITES

L'examen des voies métaboliques montre que nombre d'interconversions de métabolites sont possibles.

Les glucides peuvent être transformés en acides gras par l'intermédiaire de l'acétyl CoA ou en certains aminoacides par l'intermédiaire de l'α-cétoacide correspondant qui est alors transaminé ; ainsi, le pyruvate conduit à l'alanine, l'oxaloacétate à l'aspartate, l'α-cétoglutarate au glutamate, le 3-phosphoglycérate à la sérine. En revanche, les animaux ne peuvent pas synthétiser les glucides partir des acides gras par l'intermédiaire du cycle de l'acide citrique car ils ont perdu les enzymes qui permettent de convertir l'acétyl CoA en pyruvate ou en oxaloacétate en évitant les décarboxylations, et donc de rejoindre la gluconéogenèse. Les deux atomes de carbone du groupe acétyle de l'acétyl CoA entrent bien dans le cycle de l'acide citrique, mais deux atomes de carbone quittent le cycle dans les décarboxylations catalysées par l'isocitrate déshydrogénase et l'α-cétoglutarate déshydrogénase. Par conséquent, l'oxaloacétate est régénéré, mais il n'est pas formé de novo quant l'unité acétyle de l'acétyl CoA est oxydée par le cycle de l'acide citrique. Seuls certains micro-organismes et les végétaux peuvent synthétiser des glucides à partir des acides gras grâce au cycle du glyoxylate qui court-circuite les étapes de décarboxylation du cycle de l'acide citrique.

Les aminoacides glucoformateurs peuvent être à l'origine des atomes de carbone du glucose lorsque leur métabolisme conduit à un intermédiaire du cycle de l'acide citrique car l'oxaloacétate est susceptible de conduire au phosphoénolpyruvate, l'un des intermédiaires de la gluconéogenèse. Les aminoacides cétoformateurs peuvent être convertis en lipides dans la mesure où ils conduisent, soit à l'acétyl CoA et donc aux acides gras, soit au 3-phosphoglycéraldéhyde et donc au glycérol.

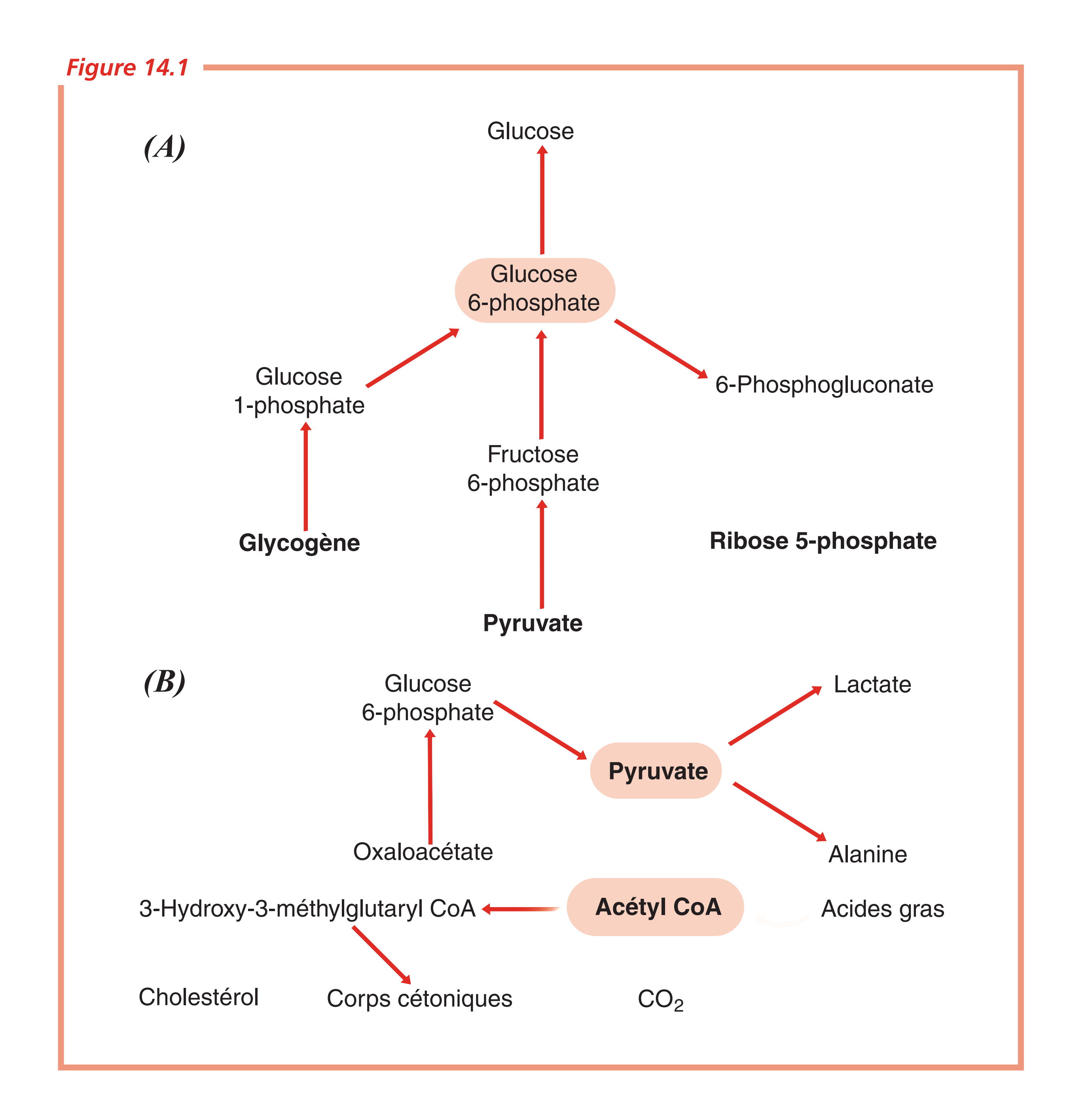
Les intermédiaires du cycle de l'acide citrique doivent être régénérés s'ils ont été utilisés pour des biosynthèses. Ainsi, l'oxaloacétate peut être formé par carboxylation du pyruvate grâce à la pyruvate carboxylase.

La biosynthèse des nucléotides, et donc des acides nucléiques, s'effectue à partir des aminoacides glycine, aspartate et glutamine, ainsi que du ribose 5-phosphate dérivé lui-même du glucose.

Les interconversions de métabolites font intervenir des carrefours clé dont les trois principaux sont le glucose 6-phosphate, le pyruvate et l'acétyl CoA (*Figures 14.1A et B*).

CONTRÔLE DES VOIES MÉTABOLIQUES ÉNERGÉTIQUES ESSENTIELLES

Le **cycle de l'acide citrique** (p. 221) et la **phosphorylation oxydative** (p. 237) qui lui fait suite constituent la voie finale commune (*hub*) de l'oxydation des molécules énergétiques, glucides, acides gras et aminoacides. Nombre de ces dernières entrent dans le cycle de l'acide citrique après avoir été oxydées en acétyl CoA, mais certains métabolites, en particulier ceux issus des aminoacides, peuvent le rejoindre à des étapes différentes. L'oxydation complète d'un acétyl CoA par le cycle de l'acide citrique crée une molécule de GTP ainsi que trois molécules de NADH et une molécule de $FADH_2$ qui représentent quatre paires



d'électrons susceptibles d'être transférés à O_2 à travers la chaîne de transport des électrons ; il en résulte alors la formation d'un gradient de protons qui conduit à la synthèse de neuf molécules d'ATP. Les donneurs d'électrons ne sont oxydés et recyclés vers le cycle de l'acide citrique que lorsque l'ADP est simultanément phosphorylé en ATP ; ce couplage, appelé contrôle respiratoire, assure que la vitesse du cycle de l'acide citrique est adaptée aux besoins en ATP.

De plus, l'ATP inhibe deux enzymes clé du cycle, l'isocitrate déshydrogénase et l'α-céto-glutarate déshydrogénase. Le cycle de l'acide citrique a aussi un rôle anabolique en fournissant le succinyl CoA pour les porphyrines et le citrate pour les acides gras.

La **β-oxydation des acides gras** (p. 192) dégrade ces derniers en acétyl CoA qui entre dans le cycle de l'acide citrique lorsque l'apport d'oxaloacétate est suffisant. Il y a, de plus, formation concomitante d'une molécule de $FADH_2$ et d'une molécule de NADH qui transfèrent leurs électrons à O_2 lorsque le NAD^+ et le FAD peuvent être régénérés ; ici encore, le contrôle respiratoire module la vitesse de la β-oxydation des acides gras en fonction des besoins en ATP.

La **glycolyse anaérobie** (p. 164) d'une molécule de glucose conduit à la formation de deux molécules de pyruvate, deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH. Elle fournit aussi des squelettes carbonés pour les biosynthèses. La phosphofructokinase, qui catalyse l'étape d'engagement de la voie, est inhibée par l'ATP ; cet effet inhibiteur est augmenté par le citrate et inversé par l'AMP. La phosphofructokinase est alors le site principal de régulation (p. 166) et la glycolyse est donc fonction des besoins en ATP.

La **désamination oxydative** (p. 210) de certains aminoacides permet à leur squelette carboné de rejoindre le cycle de l'acide citrique ; leur contribution à la production d'ATP est elle aussi régulée par le contrôle respiratoire.

Ainsi, du point de vue énergétique, la formation d'ATP est fonction de la charge énergétique de la cellule définie par la relation :

$$\text{Charge énergétique} = \frac{[\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

Lorsque l'ATP et l'acétyl CoA sont abondants, le taux de citrate augmente, ce qui accélère la vitesse de synthèse des acides gras.

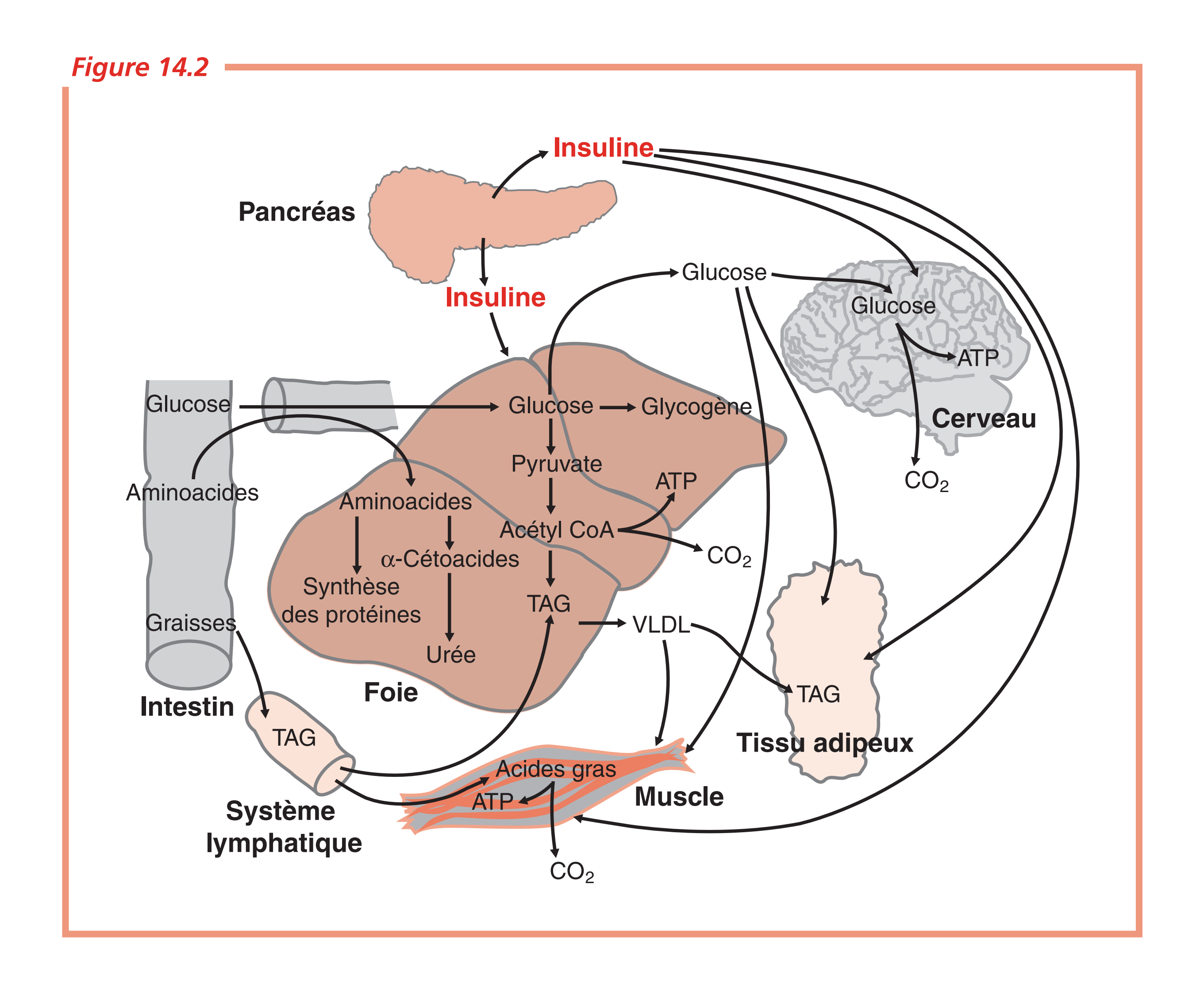
CONTRÔLE HORMONAL DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

L'action de l'insuline, du glucagon, de l'adrénaline et du cortisol en réponse aux variations du taux du glucose sanguin permet d'illustrer le rôle joué par ces hormones dans l'intégration et la régulation du métabolisme énergétique au niveau de nombreux tissus, particulièrement chez les mammifères.

Insuline

Le taux du glucose sanguin est normalement maintenu constant au niveau de 4,5 mM. Lorsqu'il a tendance à s'élever, après un repas par exemple, les cellules β du pancréas détectent cette variation et y répondent par une sécrétion d'insuline (*Figure 14.2*). En effet, le transporteur GLUT2 permet au glucose de pénétrer dans les cellules β où l'hexokinase IV (glucokinase) (p. 164) le convertit en glucose 6-phosphate qui entre dans la glycolyse. Il en résulte une augmentation du taux d'ATP qui provoque une fermeture des canaux K^+, une dépolarisation de la membrane plasmique, un influx de Ca^{2+} et une exocytose des granules d'insuline. Cette hormone, transportée par le sang, signale à l'ensemble des organes que le taux de glucose est élevé ; il est alors capté par ces derniers.

Figure 14.2



Le foie peut capter les deux tiers du glucose du sang qui y est tout d'abord converti en glucose 6-phosphate par l'hexokinase et la glucokinase spécifique du foie. L'insuline y active alors la glycogène synthase et inhibe la glycogène phosphorylase. Elle y active aussi l'oxydation du glucose 6-phosphate en pyruvate par la glycolyse et l'oxydation du pyruvate en acétyl CoA ; lorsque ce dernier n'est pas oxydé plus avant pour la production d'énergie, il est utilisé pour la synthèse d'acides gras qui sont ensuite exportés vers le tissu adipeux sous la forme de triacylglycérols (TAG) inclus dans des VLDL.

Le muscle squelettique retient le glucose, sa source préférée d'énergie pour les pointes d'activité, car il n'a pas de glucose 6-phosphatase. L'insuline y stimule la capture du glucose sanguin et y favorise la synthèse du glycogène.

Le tissu adipeux capte lui aussi du glucose après stimulation par l'insuline.

En bref, l'insuline favorise la conversion du glucose excédentaire en deux types de molécules de réserve : le glycogène dans le foie et dans le muscle et les triacylglycérols dans le tissu adipeux.

Le cerveau a le glucose pour seule molécule énergétique ; 120 grammes y sont consommés chaque jour. Cependant, pendant un jeûne prolongé, les corps cétoniques créés par le foie y

remplacent partiellement le glucose comme source d'énergie. Le cerveau n'a pas de réserves énergétiques et a donc besoin d'un apport continu de glucose, ce qui est réalisé grâce à GLUT3 dont le K_M pour le glucose à une valeur basse, de l'ordre de 1,6 mM.

Glucagon

Quelques heures après un repas, le taux du glucose sanguin diminue en raison de la capture et de l'oxydation de ce dernier par les divers organes, en particulier par le cerveau. Cette baisse est ressentie par le pancréas dont les cellules β ne sécrètent plus d'insuline mais dont les cellules α libèrent alors du glucagon. Différentes actions du glucagon lui permettent de provoquer une augmentation de la concentration du glucose sanguin (*Figure 14.3*).

Dans le foie, le glucagon stimule la dégradation du glycogène en activant la glycogène phosphorylase et en inactivant la glycogène synthase ; le mécanisme de ces effets passe par la phosphorylation cAMP-dépendante des deux enzymes. Le glucagon inhibe la dégradation du glucose par la glycolyse et stimule sa synthèse par la gluconéogenèse en abaissant la concentration du fructose 2,6-bisphosphate (p. 166), inhibiteur allostérique de la fructose 1,6-bisphosphatase et activateur de la phosphofructokinase-1. Le glucagon inhibe la pyruvate kinase par phosphorylation, ce qui conduit à une accumulation de phosphoénolpyruvate favorable à la gluconéogenèse. Le glucagon active aussi la synthèse de la PEP carboxykinase. Ainsi, par la stimulation de la glycogénolyse, par l'arrêt de la glycogénogenèse et par le déclenchement de la gluconéogenèse dans les hépatocytes, le glucagon permet au foie de libérer du glucose et de rétablir le taux normal de la glycémie.

Dans le tissu adipeux, le glucagon favorise la dégradation des TAG dont les acides gras sont exportés vers le foie où ils sont métabolisés.

En bref, le glucagon stimule la synthèse du glucose par le foie et mobilise les acides gras du tissu adipeux dont le métabolisme permet de conserver le glucose pour le cerveau. Tous ces effets sont médiés par des phosphorylations cAMP-dépendantes.

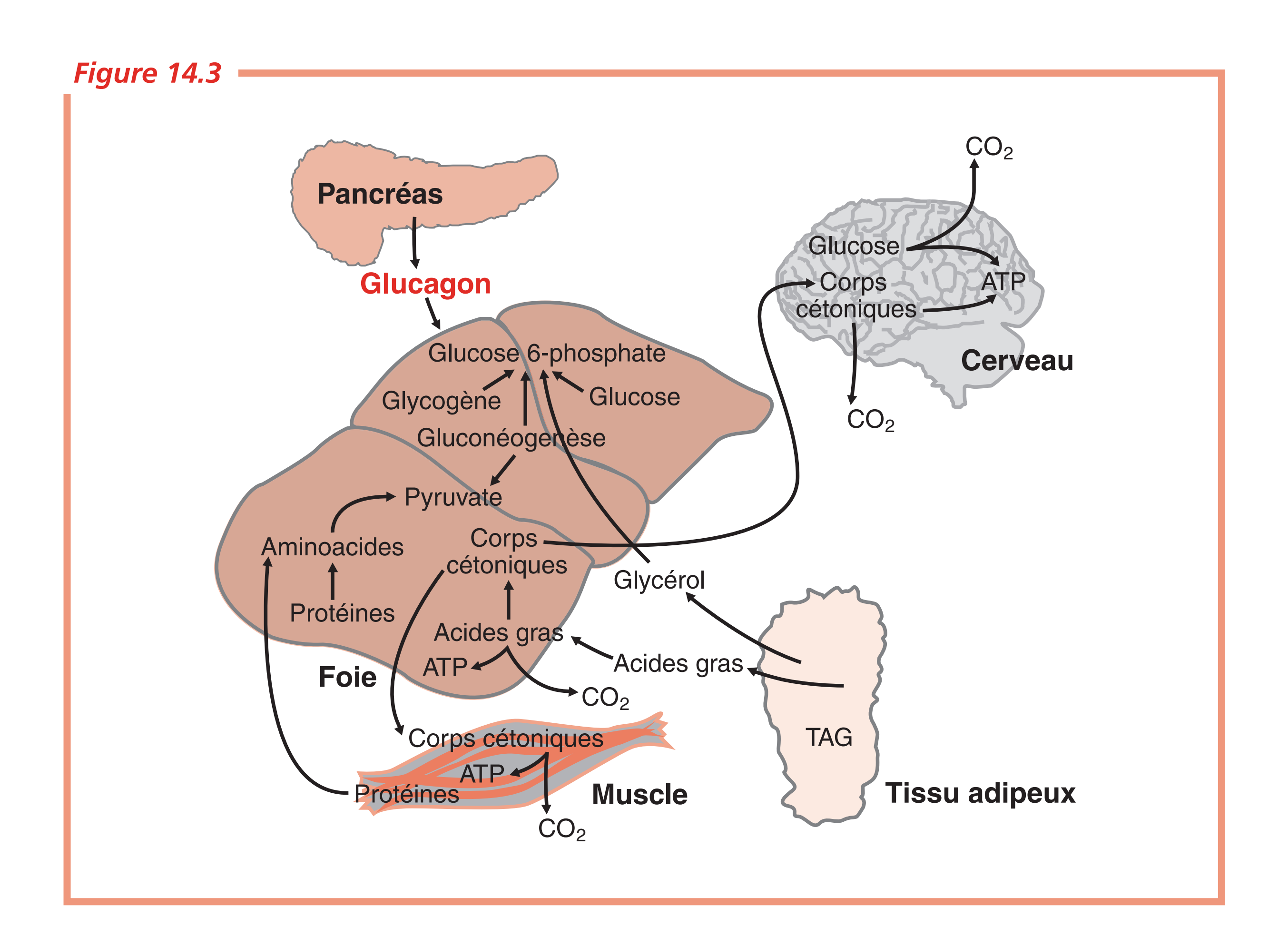
Adrénaline

Au cours du stress, de l'adrénaline et de la noradrénaline sont libérées par la médullosurrénale. Les deux hormones accélèrent le rythme cardiaque, élèvent la tension sanguine et dilatent les bronches mais, de plus, elles inactivent la glycogène synthase et activent la glycogène phosphorylase par phosphorylation cAMP-dépendante ; elles favorisent la glycolyse en augmentant la concentration du fructose 2,6-bisphosphate ; enfin, elles mobilisent le tissu adipeux.

Cortisol

Certains facteurs de stress déclenchent la sécrétion par la corticosurrénale de cortisol qui agit au niveau du foie, du muscle et du tissu adipeux, entre autres, pour leur apporter les éléments énergétiques dont ils ont besoin pour surmonter le stress.

Figure 14.3



Dans le foie, le cortisol favorise la gluconéogenèse en stimulant la synthèse de la PEP carboxykinase (le glucagon a le même effet et l'insuline l'effet opposé). Dans le muscle, le cortisol favorise la dégradation des protéines dont les aminoacides sont exportés vers le foie où ils servent de précurseurs à la gluconéogenèse. Dans le tissu adipeux, le cortisol augmente la libération des acides gras et du glycérol des TAG ; les premiers servent de source énergétique à divers tissus et le second est utilisé comme précurseur dans la gluconéogenèse.

Le glucose produit est soit exporté vers les tissus qui en ont un besoin immédiat, soit stocké dans le foie sous forme de glycogène. Les effets du cortisol contrebalancent ceux de l'insuline.

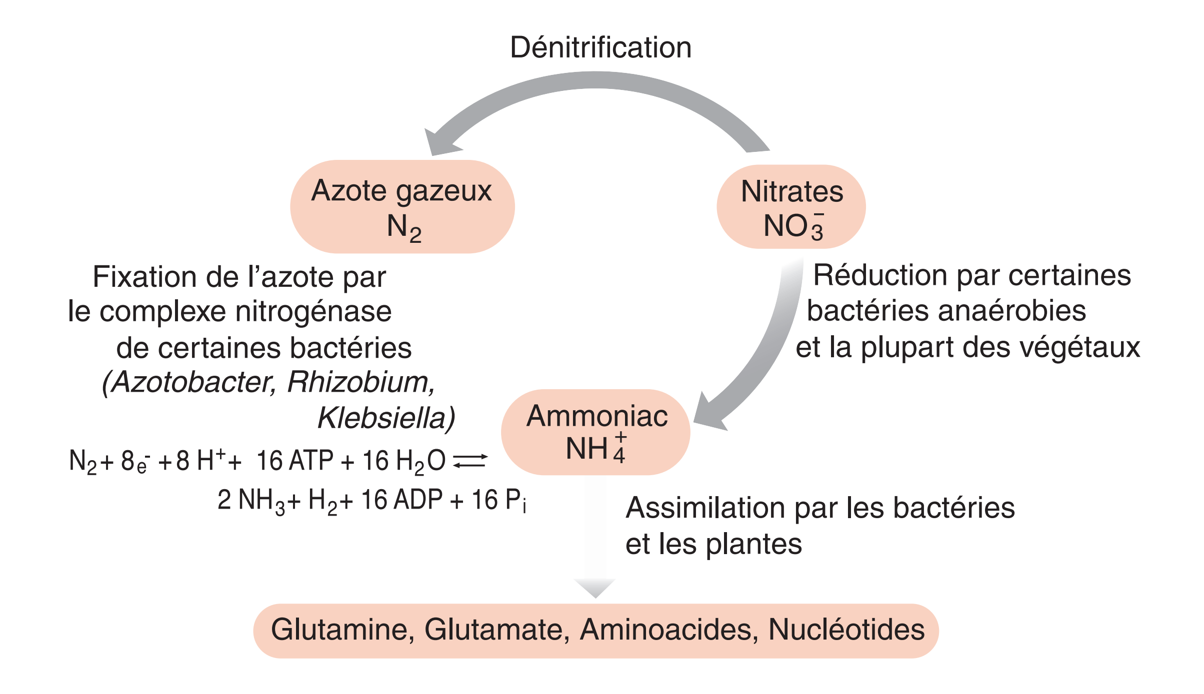
PARTIE IV

SYNTHÈSE DES BIOMOLÉCULES

L'assemblage des biomolécules polymériques que sont les protéines et les acides nucléiques nécessite la présence au sein des cellules de leurs modules constitutifs, les aminoacides et les nucléotides, respectivement, ainsi que de certains oses. De même, la formation des membranes cellulaires ne peut s'effectuer qu'à partir de lipides relativement simples. L'objet de cette quatrième partie est de présenter les modes d'acquisition ou de synthèse de ces biomolécules élémentaires, puis d'envisager les processus d'élaboration des macromolécules biologiques elles mêmes, acides nucléiques et protéines.

Tout d'abord, on doit considérer que les biosynthèses sont endergoniques ; elles nécessitent de l'énergie chimique sous forme d'ATP, du pouvoir réducteur sous forme de NADPH et des composés activés, tels que l'UDP-glucose, le CDP-diacylglycériol et les aminoacyl-tRNA. De plus, elles sont souvent favorisées par l'hydrolyse du pyrophosphate.

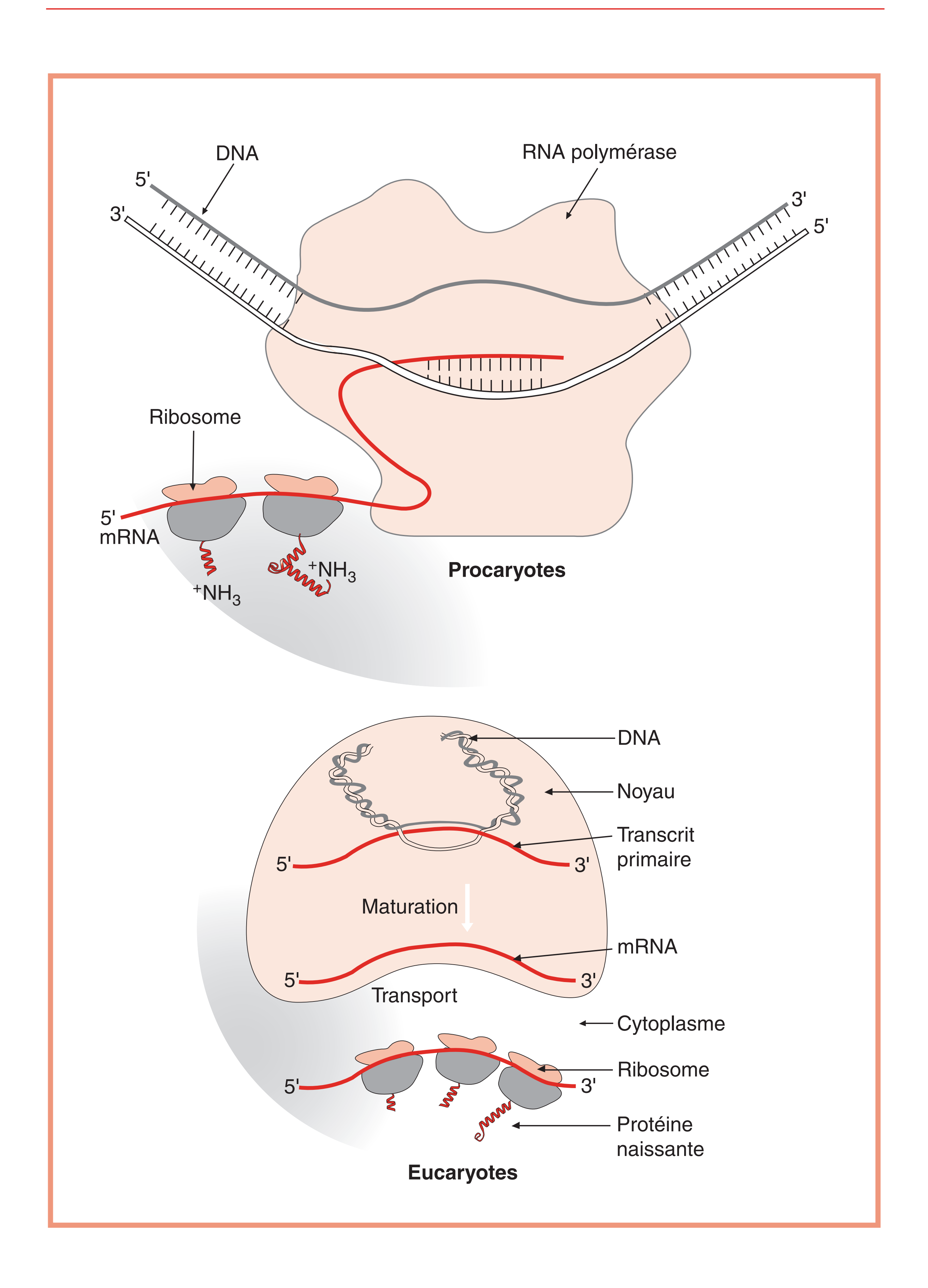
Les voies biosynthétiques des aminoacides et des nucléotides sont très anciennes et remontent aux premiers ancêtres des êtres vivants. Elles nécessitent la présence dans l'environnement d'une source d'azote qui peut être l'azote gazeux N_2 de l'atmosphère ou celui des nitrates NO_3^- des sols et des océans. N_2 et NO_3^- sont tout d'abord réduits en ions ammonium NH_4^+ que les bactéries et les plantes peuvent incorporer dans leurs aminoacides puis dans leurs nucléotides sous forme de groupes amine ou amide.



Les animaux n'ont pas cette possibilité ; ils sont donc dépendants des Bactéries et des végétaux pour l'acquisition des composés azotés qu'ils doivent trouver dans leur alimentation. À partir de ces composés, ils peuvent alors synthétiser certaines biomolécules azotées élémentaires, aminoacides et nucléotides, grâce auxquelles ils élaborent leurs propres macromolécules, protéines et acides nucléiques, ou activent divers processus métaboliques, tels que les transaminations ou la production d'énergie, entre autres. Des enzymes tels que la glutamine aminotransférase et les enzymes à pyridoxal phosphate (PLP), ainsi que des coenzymes tels que le tétrahydrofolate, la S-adénosylméthionine et le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) tiennent des rôles centraux dans la biosynthèse des aminoacides et des nucléotides.

Le DNA est la macromolécule constituée de désoxyribonucléotides dont la séquence définit et stocke l'information génétique. Sa structure en double hélice avec appariement spécifique des quatre bases, adénine-thymine, guanine-cytosine, suggère immédiatement un mécanisme possible de copiage, ou réplication, du matériel génétique. Cette information génétique est transférée au RNA, macromolécule constituée de ribonucléotides dont la séquence résulte d'une transcription de celle du DNA effectuée grâce à des RNA polymérases DNA-dépendantes. L'information alors contenue dans le RNA passe dans la structure des protéines, macromolécules constituées d'aminoacides dont la séquence résulte d'une traduction de celle du RNA au niveau des ribosomes. Ainsi, l'information codée dans le langage à quatre lettres des acides nucléiques est traduite dans le langage à vingt lettres des protéines qui se présentent comme les agents moléculaires des performances téléonomiques des êtres vivants. Chez les Procaryotes, les processus de transcription et de traduction sont étroitement couplés, tandis que, chez les Eucaryotes, ils sont séparés dans l'espace et dans le temps.

La synthèse de toutes les biomolécules polymériques, DNA, RNA et protéines, met en œuvre trois étapes : initiation, élongation et terminaison. En outre, ces processus fondamentaux sont encadrés par deux étapes supplémentaires : l'activation des précurseurs avant la synthèse et la maturation post-synthétique du polymère terminé.


DNA
RNA polymérase
5'
3'
3'
5'
Ribosome
5'
mRNA
$^+NH_3$
$^+NH_3$
Procaryotes
DNA
Noyau
Transcrit primaire
5'
3'
Maturation
mRNA
5'
3'
Transport
Cytoplasme
Ribosome
5'
3'
Protéine naissante
Eucaryotes

Chapitre 15

Biosynthèse des aminoacides

Les micro-organismes et les végétaux peuvent assimiler l'azote présent dans leur environnement lorsqu'il est sous la forme d'ions ammonium. La glutamine synthétase et la glutamate synthase tiennent un rôle central dans ce processus. Les animaux n'ont pas une telle possibilité et ils doivent donc trouver dans leur alimentation des composés azotés, essentiellement des aminoacides, qu'ils soient susceptibles d'assimiler grâce à leur propre métabolisme.

Les micro-organismes et la plupart des végétaux peuvent biosynthétiser les vingt α-aminoacides de la série L qui participent à leurs activités métaboliques et leur permettent d'édifier leurs protéines : les squelettes hydrocarbonés viennent des voies de la glycolyse, des pentoses phosphate ou du cycle de l'acide citrique et le groupe amine est apporté par le glutamate grâce à une réaction de transamination. Les animaux, dont l'Homme, ont perdu certaines voies de biosynthèse des aminoacides, en particulier les plus complexes ; seules ont été conservées les plus simples, celles qui comportent une, ou tout au plus un nombre très limité d'étapes. D'un point de vue nutritionnel, on distingue donc les aminoacides non essentiels qu'un animal est susceptible de produire et les aminoacides essentiels que ce dernier doit nécessairement trouver dans son alimentation.

La concentration des aminoacides doit correspondre à l'activité métabolique des cellules. Divers processus de modulation de l'activité des enzymes biosynthétiques des aminoacides assument une telle adaptation, soit par inhibition ou activation allostériques, soit par modification covalente.

En plus de leurs rôles dans le métabolisme et la biosynthèse des protéines, les aminoacides sont les précurseurs de nombre de biomolécules spécialisées : nucléotides, coenzymes, porphyrines, alcaloïdes, pigments, molécules signal, hormones, neuromédiateurs.

INCORPORATION DE L'AZOTE DANS LES BIOMOLÉCULES

Incorporation de l'ion ammonium dans la glutamine et le glutamate

Chez les Bactéries et dans les végétaux, l'ion ammonium NH_4^+, forme assimilable de l'azote, est incorporé dans les aminoacides glutamine et glutamate grâce à l'action de deux enzymes, la glutamine synthétase et la glutamate synthase. Les animaux n'ont pas la capacité d'assimiler l'ion ammonium et ils sont donc entièrement dépendants des Bactéries et des végétaux pour satisfaire leurs exigences en biomolécules azotées. Pour l'ensemble des organismes vivants, la glutamine synthétase et la glutamate synthase jouent donc, directement ou indirectement, des rôles centraux dans le processus de l'assimilation de l'azote par les êtres vivants.

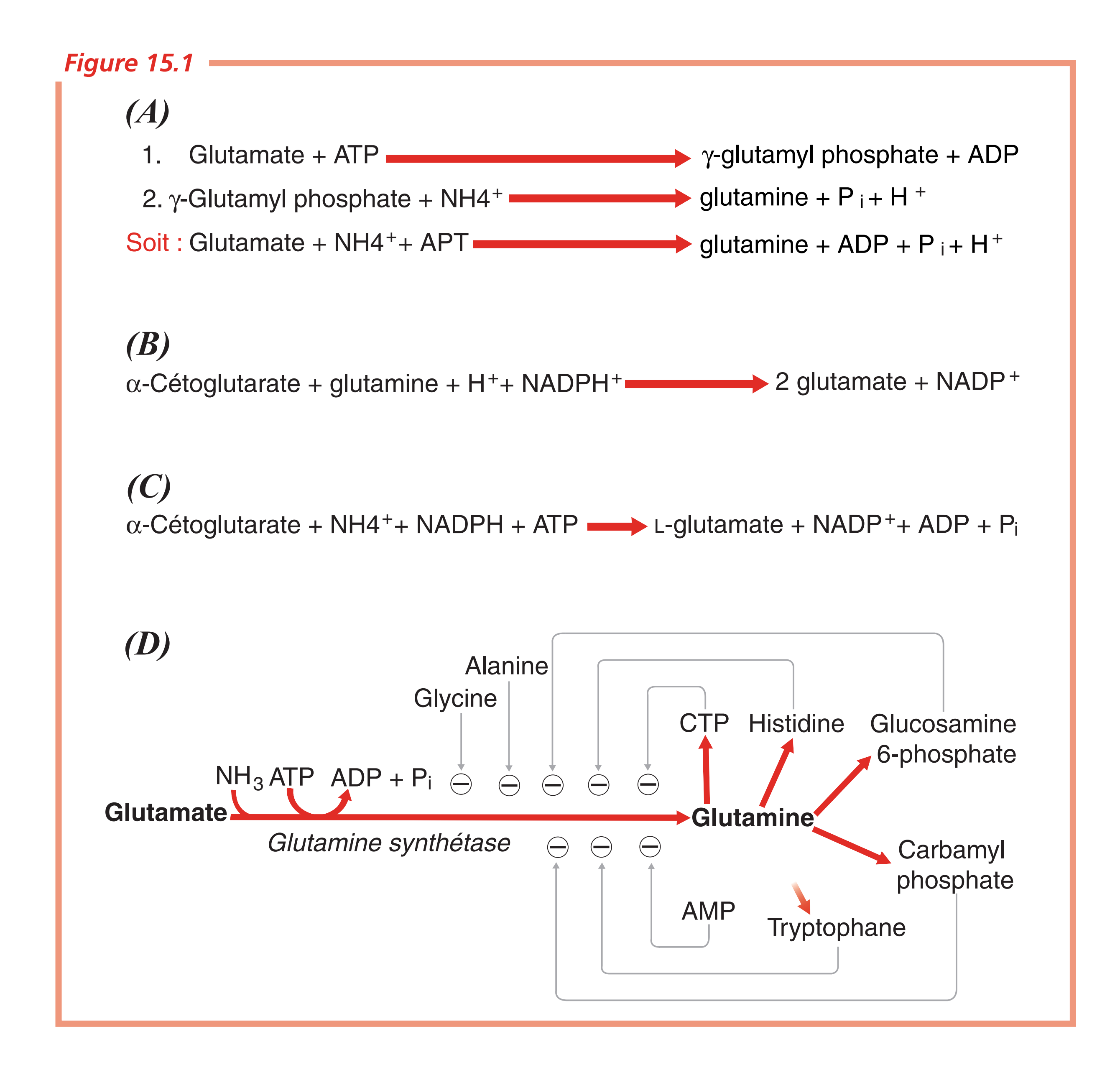
La glutamine synthétase catalyse la réaction du glutamate et du NH_4^+ qui conduit à la formation d'une molécule de glutamine (*Figure 15.1A*). Cet enzyme est présent dans tous les organismes ; chez les Bactéries et dans les végétaux, il permet l'assimilation de l'azote mais, chez les Mammifères, il n'intervient que dans le métabolisme des aminoacides en convertissant l'ion NH_4^+ libre toxique en glutamine transportable par le sang (p. 208).

La glutamate synthase permet de maintenir à un niveau constant le taux du glutamate consommé dans la réaction précédente. En effet, en présence d'un réducteur, le NADPH dans la plupart des cas, elle catalyse la réaction de l'α-cétoglutarate issu du cycle de l'acide citrique et de la glutamine formée par la glutamine synthétase, ce qui conduit à la création de deux molécules de glutamate (*Figure 15.1B*). Cet enzyme n'est retrouvé que chez les Bactéries et dans les végétaux ; chez les animaux, le taux du glutamate est assuré par la transamination des aminoacides sur l'α-cétoglutarate.

Le bilan des réactions catalysées par la glutamine synthétase et la glutamate synthase (*Figure 15.1C*) traduit donc, chez les Bactéries et dans les végétaux, l'incorporation de l'ion NH_4^+ dans l'α-cétoglutarate avec formation de L-glutamate.

Rôles biochimiques de la glutamine et du glutamate

La glutamine et le glutamate apparaissent donc, chez les Bactéries et dans les végétaux, comme les points d'entrée de l'azote sous la forme de NH_4^+. De plus, outre leur incorporation dans les protéines, ces deux aminoacides tiennent des rôles centraux dans le métabolisme ; ils interviennent dans le catabolisme de l'ammoniac et des groupes amine lors de l'oxydation des aminoacides (p. 208) ; le glutamate est la source du groupe amine de la plupart des aminoacides grâce aux réactions de transamination (p. 204) et la glutamine, par son azote amidique, celle des groupes amine dans nombre de processus biosynthétiques (p. 308 et 312). Enfin, dans la plupart des cellules et des liquides extracellulaires des organismes supérieurs, l'un de ces aminoacides, ou les deux, sont présents à des concentrations nettement supérieures à celles des autres aminoacides et leurs concentrations sont régulées en réponse aux besoins cellulaires, tant en énergie qu'en biomolécules azotées telles que certains aminoacides ou nucléotides.



Régulation de l'activité de la glutamine synthétase

En accord avec le rôle essentiel de la glutamine synthétase dans l'entrée de l'azote réduit dans les biomolécules, l'activité de cette dernière est strictement régulée. Chez *E. Coli*, l'enzyme, constitué de 12 sous-unités, subit une régulation allostérique cumulative par six produits terminaux du métabolisme de la glutamine ainsi que par la glycine et l'alanine, témoins du métabolisme des aminoacides dans la cellule (*Figure 15.1D*). Chaque inhibiteur ne produit qu'une inhibition partielle, mais l'ensemble des huit inhibiteurs inactive totalement l'enzyme ; un tel contrôle adapte à chaque instant l'activité enzymatique aux besoins métaboliques. De plus, une modification covalente par adénylylation des sous-unités sensibilise l'enzyme aux régulations allostériques ; elle résulte de l'action d'une adénylyltransférase qui répond aux taux de glutamine, d'α-cétoglutarate, d'ATP et de P_i. La glutamine synthétase adénylylée est inactive.

BIOSYNTHÈSE DES AMINOACIDES

Les organismes diffèrent grandement quant à leur possibilité de biosynthétiser les aminoacides. La plupart des Bactéries et des plantes sont capables de synthétiser les vingt aminoacides entrant dans la structure des protéines. En revanche, les Mammifères ne peuvent synthétiser que la moitié d'entre eux, habituellement ceux qui sont susceptibles d'être obtenus par des voies simples ne mettant en jeu que des métabolites courants et ne nécessitant qu'un petit nombre d'étapes ; ce sont les aminoacides non essentiels. Les autres, tels nombre d'amino-acides aliphatiques apolaires et l'ensemble des aminoacides aromatiques, élaborés par des voies complexes, doivent être apportés par l'alimentation ; ce sont les aminoacides essentiels (*Tableau 15.1*).

Les squelettes hydrocarbonés des vingt aminoacides sont apportés par les voies de la glycolyse, des pentoses phosphate ou du cycle de l'acide citrique, le groupe amine venant lui du glutamate ou de la glutamine.

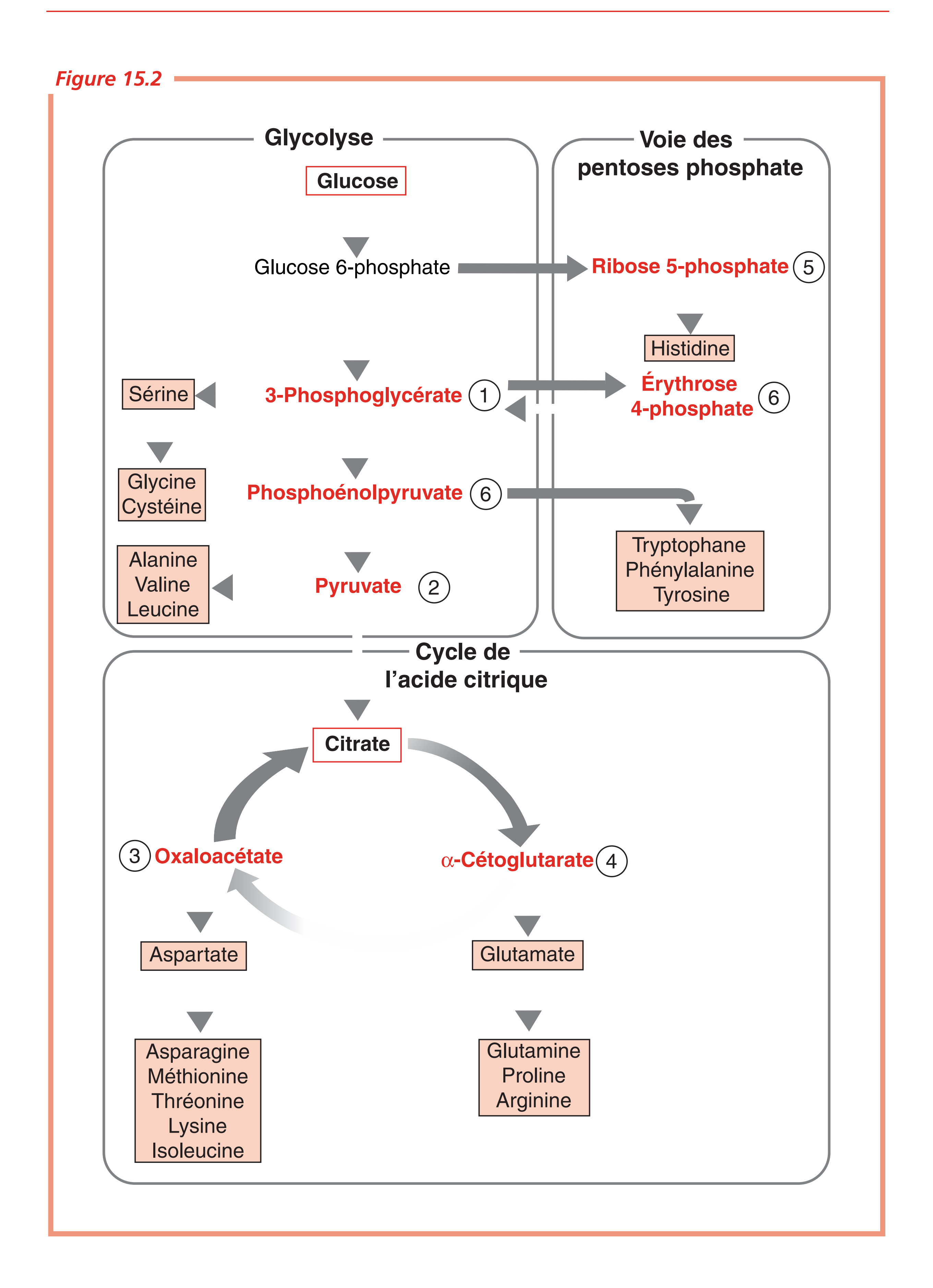
Il est habituel de grouper les voies biosynthétiques des aminoacides en six familles définies par le métabolite précurseur (*Figure 15.2*).

Tableau 15.1

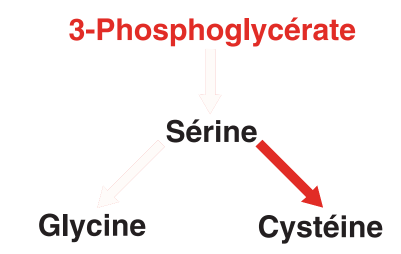
Groupe de base des 20 aminoacides	
Non essentiels chez les mammifères	**Essentiels chez les mammifères**
Alanine	Histidine
Arginine *	Isoleucine
Asparagine	Leucine
Aspartate	Lysine
Cystéine	Méthionine
Glutamate	Phénylalanine
Glutamine	Thréonine
Glycine	Tryptophane
Proline	Valine
Sérine	
Tyrosine	

* Essentiel chez le jeune

Figure 15.2


Glycolyse
Glucose
Glucose 6-phosphate
3-Phosphoglycérate
1
Sérine
Glycine
Cystéine
Phosphoénolpyruvate
6
Alanine
Valine
Leucine
Pyruvate
2
Voie des pentoses phosphate
Ribose 5-phosphate
5
Histidine
Érythrose 4-phosphate
6
Tryptophane
Phénylalanine
Tyrosine
Cycle de l'acide citrique
Citrate
3
Oxaloacétate
α-Cétoglutarate
4
Aspartate
Asparagine
Méthionine
Thréonine
Lysine
Isoleucine
Glutamate
Glutamine
Proline
Arginine

Le 3-phosphoglycérate conduit à la sérine, la glycine et la cystéine

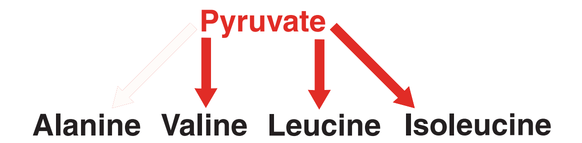


Le 3-phosphoglycérate, intermédiaire de la glycolyse, est tout d'abord oxydé en 3-phosphohydroxypyruvate grâce à l'action d'un enzyme allostérique, la 3-phosphoglycérate déshydrogénase ; il est ensuite transaminé (*Figure 15.3A*).

La 3-phosphosérine ainsi créée est hydrolysée en sérine (*Figure 15.3B*). Cette dernière est le précurseur de la glycine ; la sérine hydroxyméthyltransférase, enzyme à PLP homologue de l'aspartate transaminase, élimine de la sérine le carbone β qui est transféré au tétrahydrofolate avec formation de N^5, N^{10}-méthylènetétrahydrofolate.

Chez les mammifères, la cystéine est synthétisée à partir de la sérine qui apporte le squelette hydrocarboné et de l'homocystéine, elle-même dérivée de la méthionine, qui fournit l'atome de soufre (*Figure 15.3C*). La formation de la cystathionine intermédiaire résulte de l'action de la cystathionine β-synthase, autre enzyme à PLP homologue de l'aspartate transaminase.

Le pyruvate conduit à l'alanine, la valine, la leucine et l'isoleucine



L'alanine est biosynthétisée par transamination du pyruvate. Cette réaction simple peut s'effectuer dans tous les organismes et fait donc de l'alanine un aminoacide non essentiel.

$$\text{Pyruvate + glutamate} \rightleftharpoons \text{alanine} + \alpha\text{-cétoglutarate}$$

La valine, la leucine et l'isoleucine sont des aminoacides essentiels biosynthétisés par des voies complexes et interconnectées dont l'étude sort du cadre de cet ouvrage.

Figure 15.3

(A)

$COO^{\ominus}$ / $H-C-OH$ / CH_2-O-Ⓟ — **3-Phosphoglycérate**

NAD^+ → $NADH + H^+$ — *Phosphoglycérate déshydrogénase*

$COO^{\ominus}$ / $C=O$ / CH_2-O-Ⓟ — **3-Phosphohydroxypyruvate**

Glu → α-Cétoglutarate — *Phosphosérine aminotransférase*

$COO^{\ominus}$ / $H_3\overset{\oplus}{N}-C-H$ / CH_2-O-Ⓟ — **3-Phosphosérine**

(B)

Phosphosérine

H_2O → P_i — *Phosphosérine phosphatase*

$COO^{\ominus}$ / $H_3\overset{\oplus}{N}-C-H$ / CH_2OH — **Sérine**

THF → N^5, N^{10}-Méthylène THF; PLP; H_2O — *Sérine hydroxyméthyl transférase*

$COO^{\ominus}$ / $H_3\overset{\oplus}{N}-C-H$ / H — **Glycine**

(C)

$^{\ominus}OOC-CH(\overset{\oplus}{N}H_3)-CH_2-CH_2-SH$ + $HOCH_2-CH(\overset{\oplus}{N}H_3)-COO^{\ominus}$

Homocystéine **Sérine**

Cystathionine β-synthase PLP

H_2O

$^{\ominus}OOC-CH(\overset{\oplus}{N}H_3)-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH(\overset{\ominus}{N}H_3)-COO^{\ominus}$

Cystathionine

H_2O

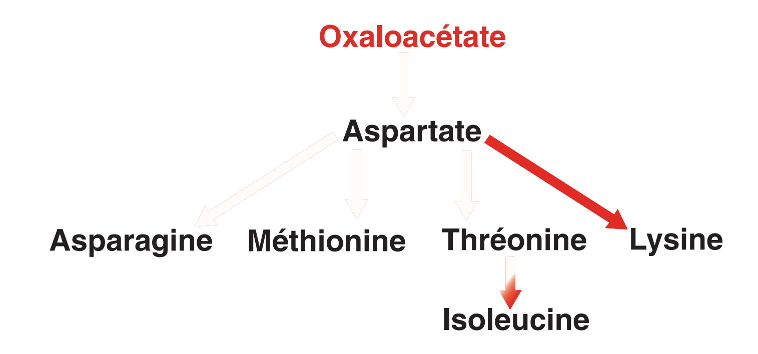
Cystathionine α-lyase PLP

$NH_4^{\oplus}$

$^{\ominus}OOC-C(=O)-CH_2-CH_3$ + $HS-CH_2-CH(\overset{\oplus}{N}H_3)-COO^{\ominus}$

α-Cétobutyrate **Cystéine**

L'oxaloacétate conduit à l'aspartate, l'asparagine, la méthionine, la thréonine, l'isoleucine et la lysine

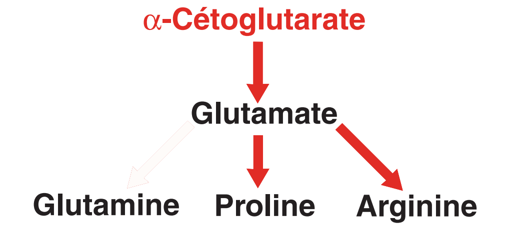


L'aspartate est biosynthétisé par transamination de l'oxaloacétate. Ici encore, cette réaction simple peut s'effectuer dans tous les organismes et fait donc de l'aspartate un aminoacide non essentiel qui conduit à l'asparagine par amidation aux dépens de la glutamine.

$$\text{Oxaloacétate + glutamate} \rightleftharpoons \text{aspartate + } \alpha\text{-cétoglutarate}$$

La méthionine, la thréonine et l'isoleucine, ainsi que la lysine, sont des aminoacides essentiels dont la biosynthèse fait appel à des voies complexes et interconnectées qui ne seront pas étudiées ici.

L'α-cétoglutarate conduit au glutamate, à la glutamine, à la proline et à l'arginine



La synthèse du glutamate par amination réductrice de l'α-cétoglutarate ainsi que celle de la glutamine ont déjà été exposées (p. 292).

Le glutamate est le précurseur de la proline et de l'arginine, deux aminoacides non essentiels. Son γ-carboxyle est tout d'abord réduit en γ-semialdéhyde, le glutamate γ-semialdéhyde (*Figure 15.4A*).

Ce dernier peut soit se cycliser et donner la proline, soit être transaminé pour former l'ornithine qui conduit à l'arginine par le cycle de l'urée (*Figure 15.4B*).

Figure 15.4

(A)

ATP + NADPH → ADP + P_i + $NADP^+$

Glutamate → Glutamate γ-sémialdéhyde

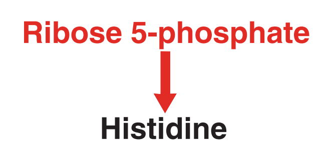
(B)

Glutamate γ-sémialdéhyde (Glutamate → α-Cétoglutarate) → Ornithine → Cycle de l'urée → Arginine

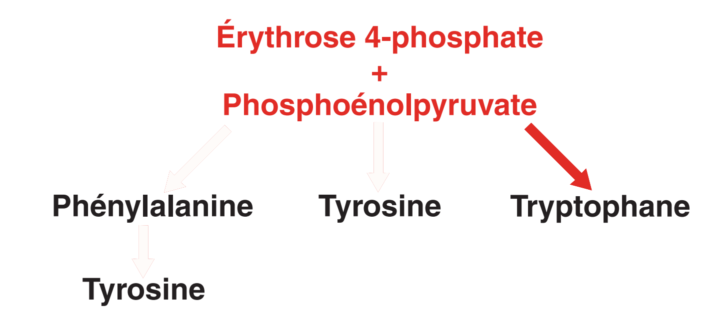
Glutamate γ-sémialdéhyde → H_2O → Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate (NADPH → $NADP^+$) → Proline

L'histidine dérive en partie du ribose 5-phosphate

La biosynthèse de l'histidine dans les micro-organismes et les végétaux est particulière en ce sens qu'elle s'effectue en neuf étapes à partir de trois précurseurs : le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) qui apporte cinq atomes de carbone, le cycle purine de l'ATP d'où proviennent un atome d'azote et un atome de carbone, et enfin la glutamine qui donne le deuxième atome d'azote. L'étude de cette voie complexe dépasse le cadre de cet ouvrage.



Les aminoacides aromatiques se forment à partir du chorismate



Les aminoacides aromatiques phénylalanine, tyrosine et tryptophane sont biosynthétisés par des voies complexes que seuls les micro-organismes et les végétaux sont susceptibles de mettre en œuvre. Pour l'Homme, ce sont des aminoacides essentiels qu'il doit trouver dans son alimentation.

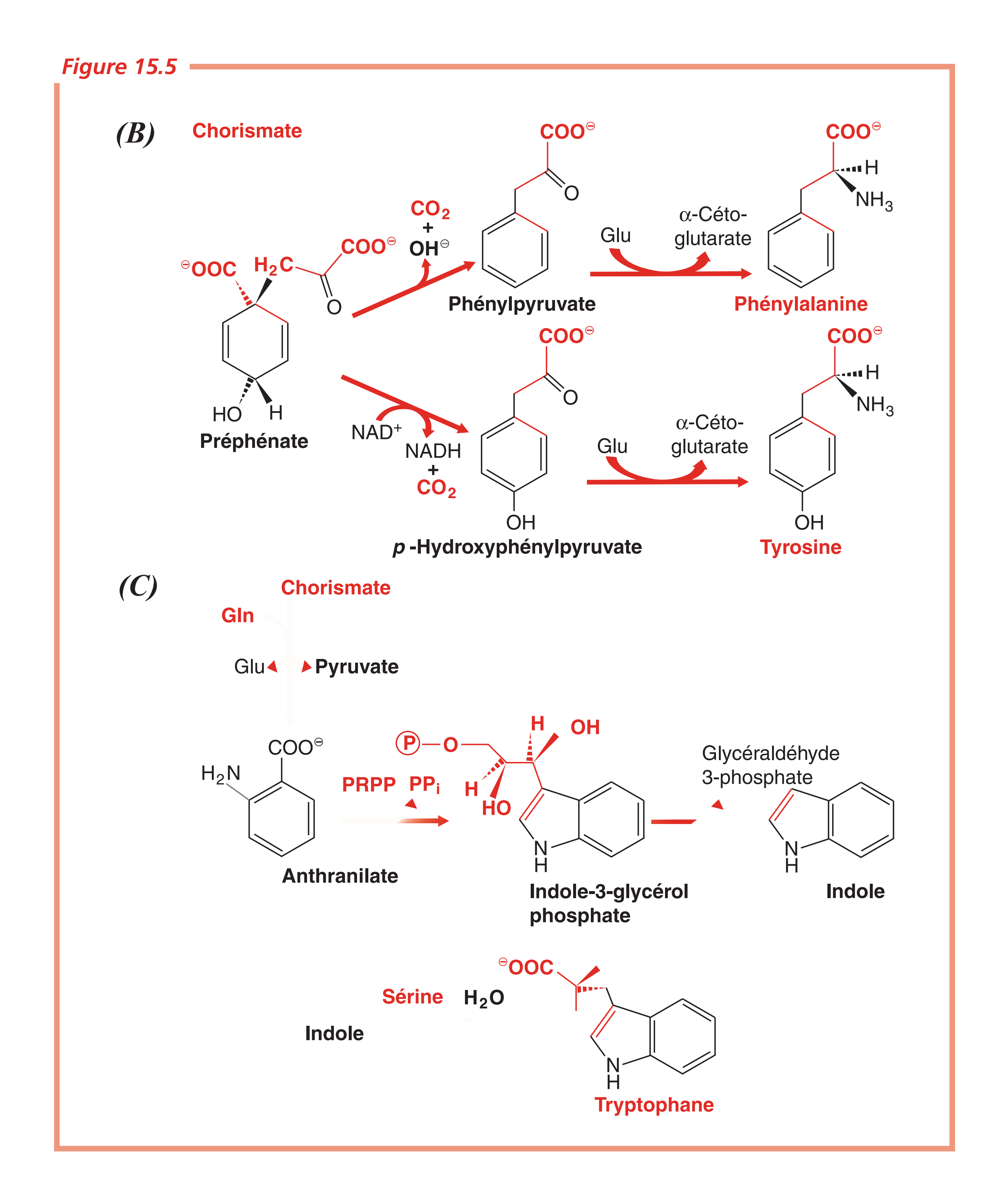
Dans une étape initiale (*Figure 15.5A*), le phosphoénolpyruvate et l'érythrose 4-phosphate se condensent avec formation d'un heptose, le 3-désoxyarabinoheptulosanate 7-phosphate. Une suite de réactions faisant intervenir successivement une cyclisation, une déshydratation, puis une réduction par le NADPH, conduit au shikimate. Ce dernier se condense avec une seconde molécule de phosphoénolpyruvate et l'intermédiaire qui en résulte donne le chorismate.

Figure 15.5

(A)

Phosphoénolpyruvate + Érythrose 4-phosphate → (H_2O, P_i) → 3-Désoxyarabino-heptulosanate 7-phosphate → (NAD^+, NADH, NADPH, $NADP^+$) → Shikimate →

Phosphoénolpyruvate + Shikimate 3-phosphate → Chorismate



Le chorismate peut être converti soit en préphénate (*Figure 15.5B*) puis en phénylalanine et en tyrosine, soit en anthranilate (*Figure 15.5C*) puis en indole-3-glycérol phosphate ; ce dernier, au cours d'une réaction en plusieurs étapes catalysée par un enzyme complexe, la tryptophane synthase, conduit à l'indole puis au tryptophane.

RÉGULATION DE LA BIOSYNTHÈSE DES AMINOACIDES

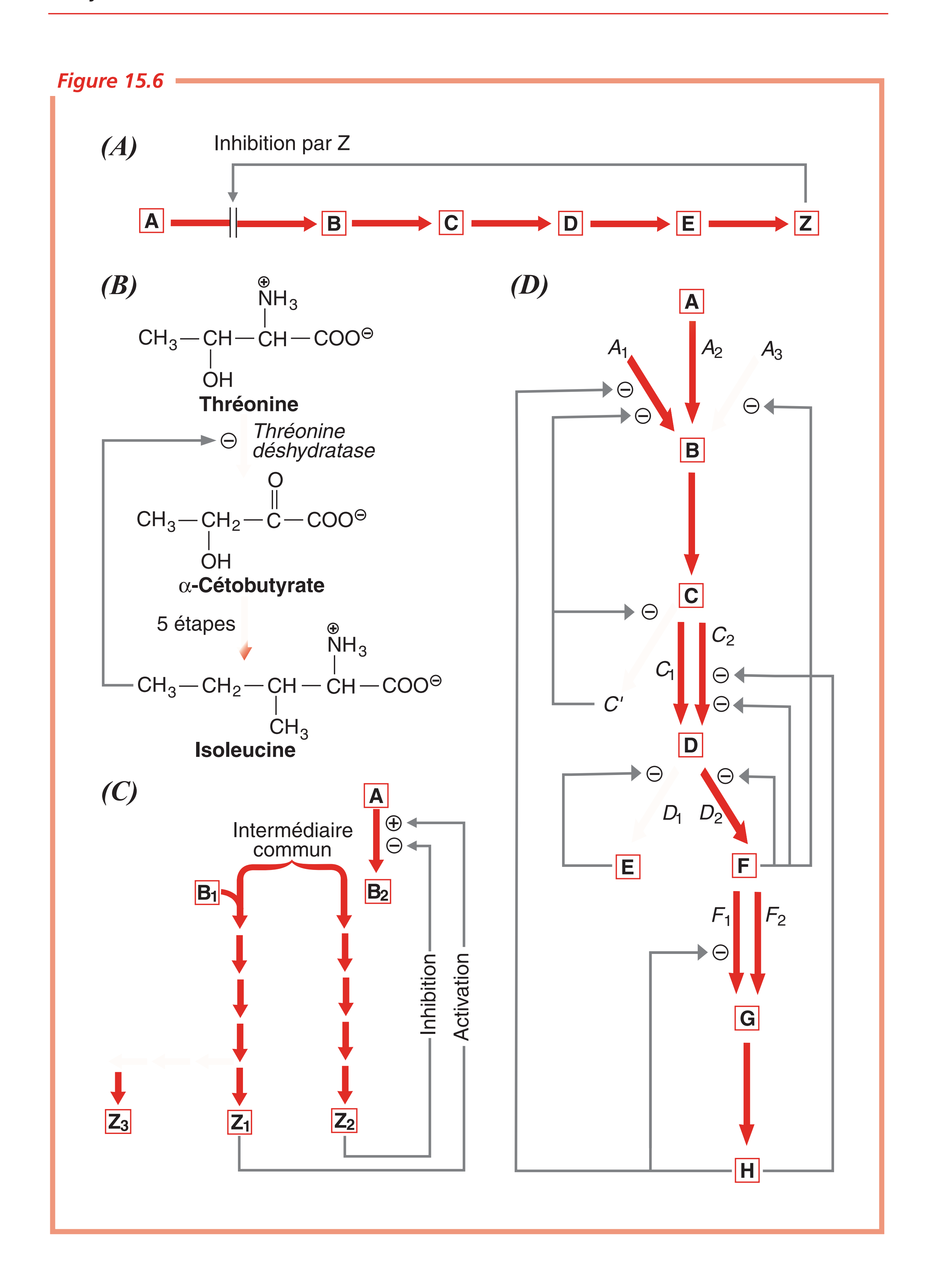
La concentration de chaque aminoacide au sein d'une cellule doit être en harmonie avec l'activité métabolique de cette dernière. Le taux et l'activité des enzymes qui participent à la biosynthèse des aminoacides doivent donc être très précisément régulés. Le contrôle du taux des enzymes sera envisagé dans un chapitre ultérieur (p. 374). En revanche, celui de l'activité sera considéré ici. La régulation de l'activité des enzymes qui catalysent la biosynthèse des aminoacides est essentiellement de nature allostérique (p. 148), mais divers modes sont mis en œuvre.

Un premier mode est la régulation allostérique par rétroinhibition. La première réaction irréversible, appelée étape d'engagement, est inhibée par le produit final de la voie (*Figure 15.6A*). Le premier exemple à avoir été décrit est celui de la synthèse de l'isoleucine à partir de la thréonine (*Figure 15.6B*). De même, la synthèse de la sérine à partir du 3-phosphoglycérate (p. 170) est engagée par la 3-phosphoglycérate déshydrogénase, enzyme allostérique qui, chez *E. Coli*, est constitué de quatre sous-unités possédant chacune un domaine catalytique et un domaine régulateur ; la liaison de la sérine à ces derniers diminue la valeur du V_{max} de l'enzyme. Ainsi, lorsque l'aminoacide est abondant dans la cellule, l'activité enzymatique s'arrête, l'élément de synthèse clé est conservé et l'équilibre métabolique est respecté.

Cependant, la régulation allostérique peut être considérablement plus élaborée. Un exemple en est l'inhibition concertée, ou rétroinhibition cumulative, précédemment étudiée (p. 293), exercée sur la glutamine synthétase par six produits dérivés de la glutamine et deux aminoacides, la glycine et l'alanine.

La régulation des voies branchées est plus complexe étant donné que les concentrations de tous les aminoacides formés doivent être prises en compte. Plusieurs mécanismes de rétroinhibition ont été mis en évidence. Ainsi, dans un premier mécanisme, dit de rétroinhibition et d'activation, un enzyme est inhibé par le produit de la voie et activé par le produit final d'une voie compétitive (*Figure 15.6C*).

Un second mécanisme est la multiplicité enzymatique fondée sur la multiplication de gènes codant pour des isoenzymes biosynthétiques contrôlés indépendamment par des modulateurs différents (*Figure 15.6D*).


Figure 15.6
(A)
Inhibition par Z
A
B
C
D
E
Z
(B)
NH3
CH3—CH—CH—COO
OH
Thréonine
Thréonine déshydratase
O
CH3—CH2—C—COO
OH
α-Cétobutyrate
5 étapes
NH3
CH3—CH2—CH—CH—COO
CH3
Isoleucine
(C)
Intermédiaire commun
A
B1
B2
Z3
Z1
Z2
Inhibition
Activation
(D)
A
A1
A2
A3
B
C
C1
C2
C'
D
D1
D2
E
F
F1
F2
G
H

BIOMOLÉCULES DÉRIVÉES DES AMINOACIDES

Outre leurs rôles dans le métabolisme et la synthèse des protéines, les aminoacides sont les précurseurs de nombre de biomolécules spécialisées parmi lesquelles figurent, entre autres, les bases puriques ou pyrimidiques (p. 308 et 312), les porphyrines, des substances vasodilatatrices telles que l'histamine, des pigments, des alcaloïdes, des hormones telles que la thyroxine ou l'adrénaline, des neuromédiateurs tels que la sérotonine et des molécules signal telles que le monoxyde d'azote.

Porphyrines

La glycine est un précurseur majeur des porphyrines dont dérivent les hèmes présents en tant que groupe prosthétique dans nombre de protéines, les hémoglobines et les cytochromes, entre autres. Dans une première étape, la glycine réagit avec le succinyl CoA pour donner l'α-amino-β-cétoadipate, puis le δ-aminolévulinate dont deux molécules s'unissent pour former un dérivé pyrrolique, le porphobilinogène (*Figure 15.7A*). Des réactions enzymatiques complexes mettant en jeu quatre molécules de porphobilinogène font apparaître une série de composés tétrapyrroliques dont le dernier, la protoporphyrine, incorpore sous l'action d'une ferrochélatase l'atome de fer qui caractérise le protohème (*Figure 15.7B*). Lorsque des défauts génétiques affectent des gènes qui interviennent dans la biosynthèse des porphyrines, il apparaît chez les sujets qui en sont affligés des affections souvent graves et invalidantes, connues sous le nom de porphyries.

Figure 15.7

(A)

Glycine
$CoA-SH$
δ-Aminolévulinate synthase
CO_2
δ-Aminolévulinate synthase

Succinyl-CoA **α-Amino-β-cétoadipate** **δ-Aminolévulinate**

Figure 15.7

(B)

δ-Aminolévulinate

①

Porphobilinogène

② 4 NH_4^+

Tétrapyrrole linéaire

③ H_2O

Uroporphyrinogène III

④ 4 CO_2

Coproporphyrinogène III

⑤ 2 CO_2

Protoporphyrinogène

⑥

Protoporphyrine IX

⑦ Fe^{2+}

Hème

Ac : $-CH_2-COO^{\ominus}$

Pr : $-(CH_2)_2-COO^{\ominus}$

V : $-CH=CH_2$

① *Porphobilinogène synthase*

② *Uroporphyrinogène synthase*

③ *Uroporphyrinogène III cosynthase*

④ *Uroporphyrinogène décarboxylase*

⑤ *Coproporphyrinogène oxydase*

⑥ *Protoporphyrinogène oxydase*

⑦ *Ferrochélatase*

Chapitre 16

Biosynthèse des nucléotides

Les nucléotides interviennent dans nombre de processus fondamentaux des manifestations vitales. Les nucléotides sont les modules élémentaires à partir desquels sont construits les acides nucléiques, DNA et RNA ; dans les organismes vivants actuels, ils sont donc nécessaires à la réplication du DNA du génome et à la transcription de l'information génétique dans le RNA. Des nucléotides adényliques font partie intégrante de quatre coenzymes essentiels intervenant dans de nombreux processus métaboliques : NAD, NADP, FAD et CoA. L'ATP est l'unité universelle d'énergie biologique et le GTP apporte l'énergie nécessaire à certains mouvements de macromolécules, en particulier lors de la biosynthèse des chaînes polypeptidiques. Des dérivés nucléotidiques tels que l'UDP-glucose et le CDP-diacylglycérol sont des intermédiaires activés dans la biosynthèse du glycogène ou des phosphoglycérolipides, respectivement. Les chaînes polypeptidiques sont assemblées à partir d'aminoacides activés sous forme d'aminoacyl-tRNA. Enfin, des nucléotides participent à la transduction des signaux ; ainsi, le cAMP et le cGMP sont des seconds messagers qui transmettent des signaux au sein des cellules et l'ATP et le GTP donnent les groupes phosphoryle nécessaires aux kinases.

Les nucléotides sont synthétisés selon deux types de voies : les voies *de novo* et les voies de récupération. Dans les voies *de novo*, les bases puriques ou pyrimidiques sont assemblées à partir de précurseurs simples : des aminoacides, tels que la glycine, l'aspartate et la glutamine qui apportent les éléments de base, l'ion bicarbonate CO_3H^-, l'ion ammonium NH_4^+ et enfin des dérivés activés du tétrahydrofolate. Dans les ribonucléotides pyrimidiques, l'unité ose-phosphate est apportée par un donneur activé, le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP). En revanche, les ribonucléotides puriques sont assemblés directement sur le PRPP.

Le DNA est constitué de désoxyribonucléotides synthétisés par réduction de l'atome de carbone C-2' des ribonucléotides par une ribonucléotide réductase. De plus, l'une des deux bases pyrimidiques est non pas l'uracile, mais son dérivé méthylé, la thymine, qui est obtenue grâce à l'action de la thymidylate synthase. Ainsi, les deux enzymes, ribonucléotide réductase et thymidylate synthase ont permis le passage d'un monde à RNA à un monde à DNA.

Dans les voies de récupération, des bases préformées sont récupérées et unies au PRPP.

Certaines étapes des voies de biosynthèse des nucléotides sont le point d'attaque de diverses molécules susceptibles de les bloquer. C'est en particulier le cas de médicaments utilisés dans le traitement de certains cancers.

SYNTHÈSE *DE NOVO* DES RIBONUCLÉOTIDES PYRIMIDIQUES

Dans la synthèse *de novo* des ribonucléotides pyrimidiques, le cycle pyrimidique est synthétisé en premier, puis il est fixé au PRPP (*Figure 16.1A*).

Dans une première étape, le carbamyl phosphate est formé à partir du bicarbonate et de l'ammoniac résultant de l'hydrolyse de la glutamine au cours d'une réaction complexe (*Figure 16.1B*) catalysée par la carbamyl phosphate synthétase II cytosolique (*Figure 16.1C*). Cet enzyme est différent de la carbamyl phosphate synthétase I mitochondriale qui intervient dans la synthèse de l'urée (p. 208). Il est constitué de deux chaînes. La plus petite contient un site d'hydrolyse de la glutamine qui génère l'ammoniac. La plus grosse a deux domaines homologues qui catalysent chacun l'une des deux étapes ATP-dépendantes ; ces derniers possèdent tous deux une structure susceptible de fixer et d'orienter l'ATP de façon telle qu'il puisse subir une attaque au niveau de son groupe phosphoryle γ. Les intermédiaires créés se déplacent dans l'enzyme, sans avoir à le quitter, au sein d'un canal moléculaire.

Figure 16.1

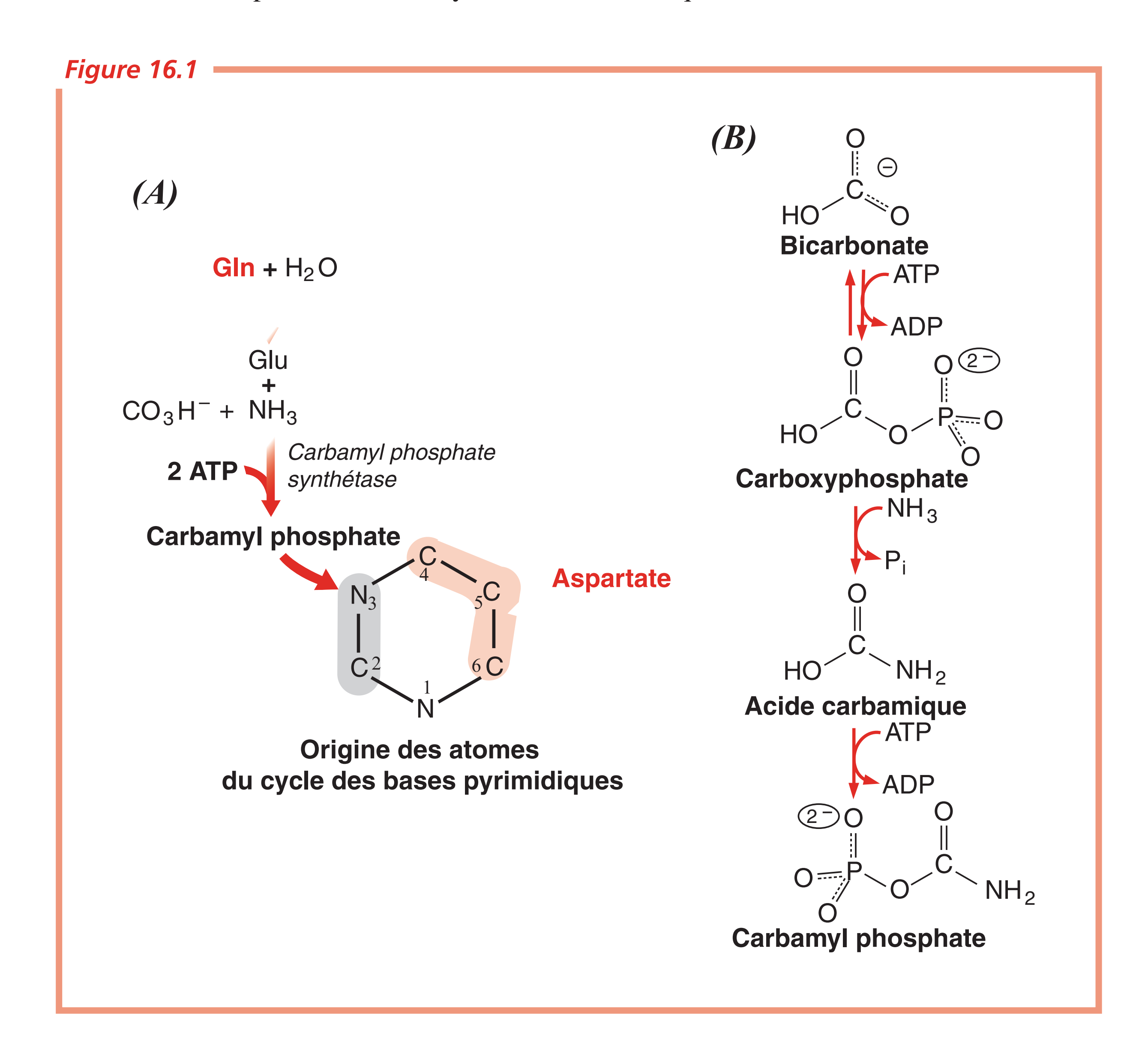
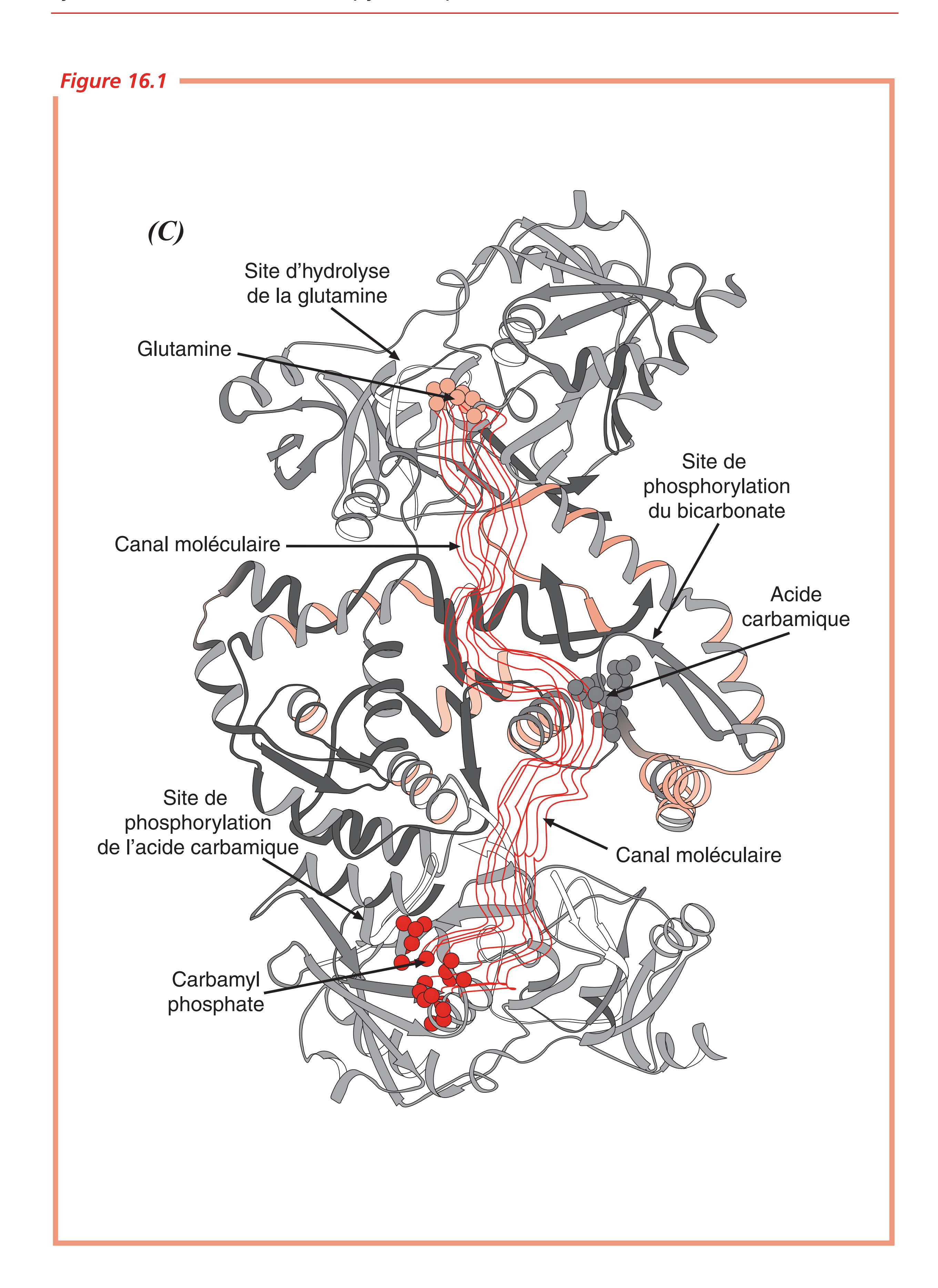


Figure 16.1


(C)
Site d'hydrolyse de la glutamine
Glutamine
Site de phosphorylation du bicarbonate
Canal moléculaire
Acide carbamique
Site de phosphorylation de l'acide carbamique
Canal moléculaire
Carbamyl phosphate

Puis, au cours d'une réaction catalysée par l'aspartate transcarbamylase (ATCase) (p. 150), le carbamyl phosphate réagit avec l'aspartate pour former le carbamylaspartate ; ce dernier se cyclise en dihydroorotate qui est ensuite oxydé en orotate (*Figure 16.2A*). L'orotate se couple alors au PRPP, au cours d'une réaction catalysée par la pyrimidine phosphoribosyltransférase, pour former l'orotidylate qui est ensuite décarboxylé par l'orotidylate décarboxylase en uridylate (UMP).

L'UMP est le précurseur des autres ribonucléotides pyrimidiques. En effet, il peut être phosphorylé en UDP puis en UTP et ce dernier donne le cytidine triphosphate (CTP) par remplacement de l'un de ses groupes carbonyle par un groupe amine apporté par la glutamine (*Figure 16.2B*).

La biosynthèse des ribonucléotides pyrimidiques, est régulée par rétroinhibition. L'ATCase, l'un des enzymes clé de la régulation, est inhibée par le CTP, produit final de la voie de biosynthèse des ribonucléotides pyrimidiques, et stimulée par l'ATP, produit final de la voie de biosynthèse des ribonucléotides puriques (p. 150).

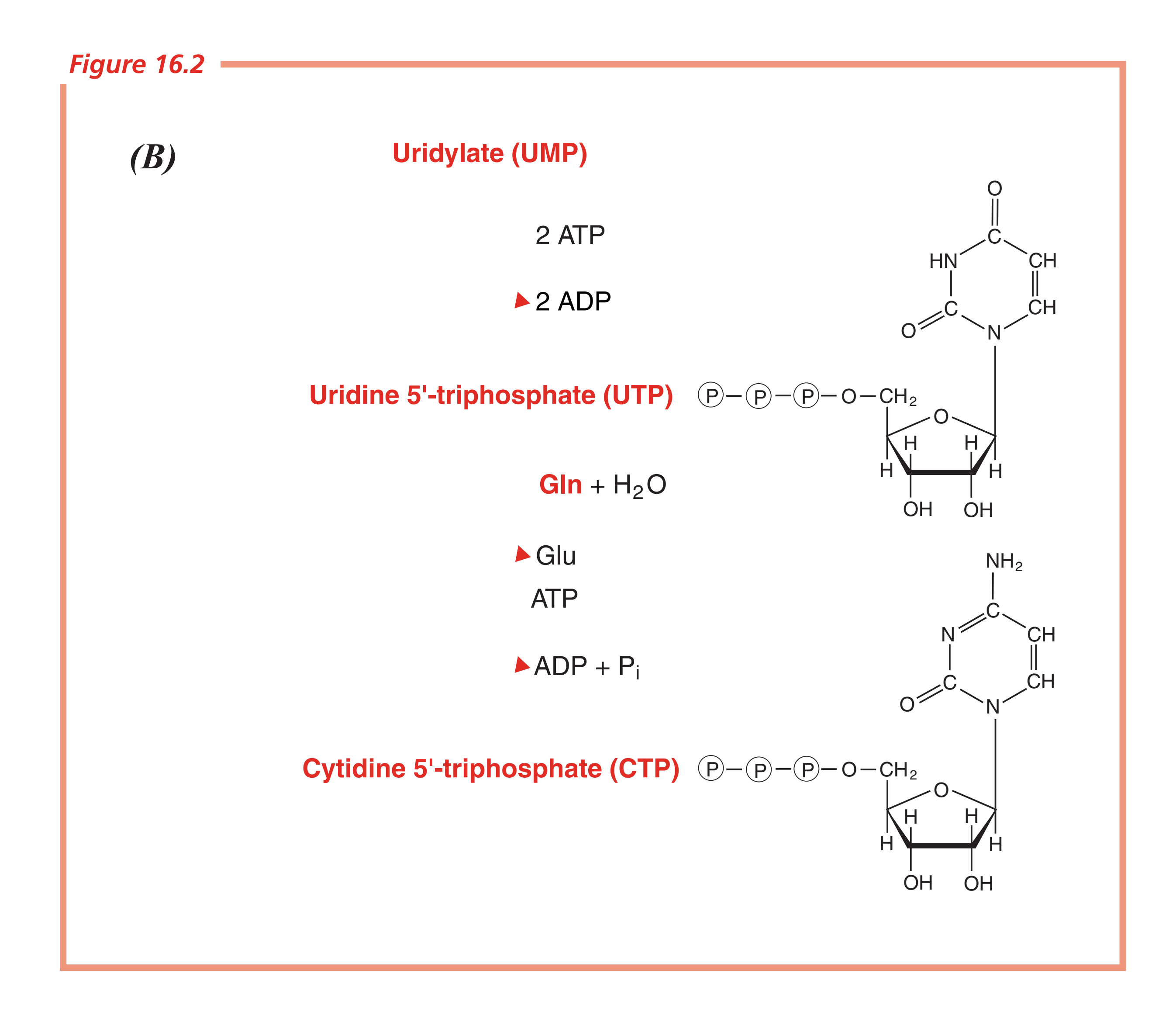


Figure 16.2

(A)

Carbamyl phosphate
P_i
N-Carbamylaspartate
H_2O
L-Dihydroorotate
NAD^+
$NADH + H^+$
Orotate
PRPP
PP_i
5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP)
Orotidylate
CO_2
Uridylate (UMP)

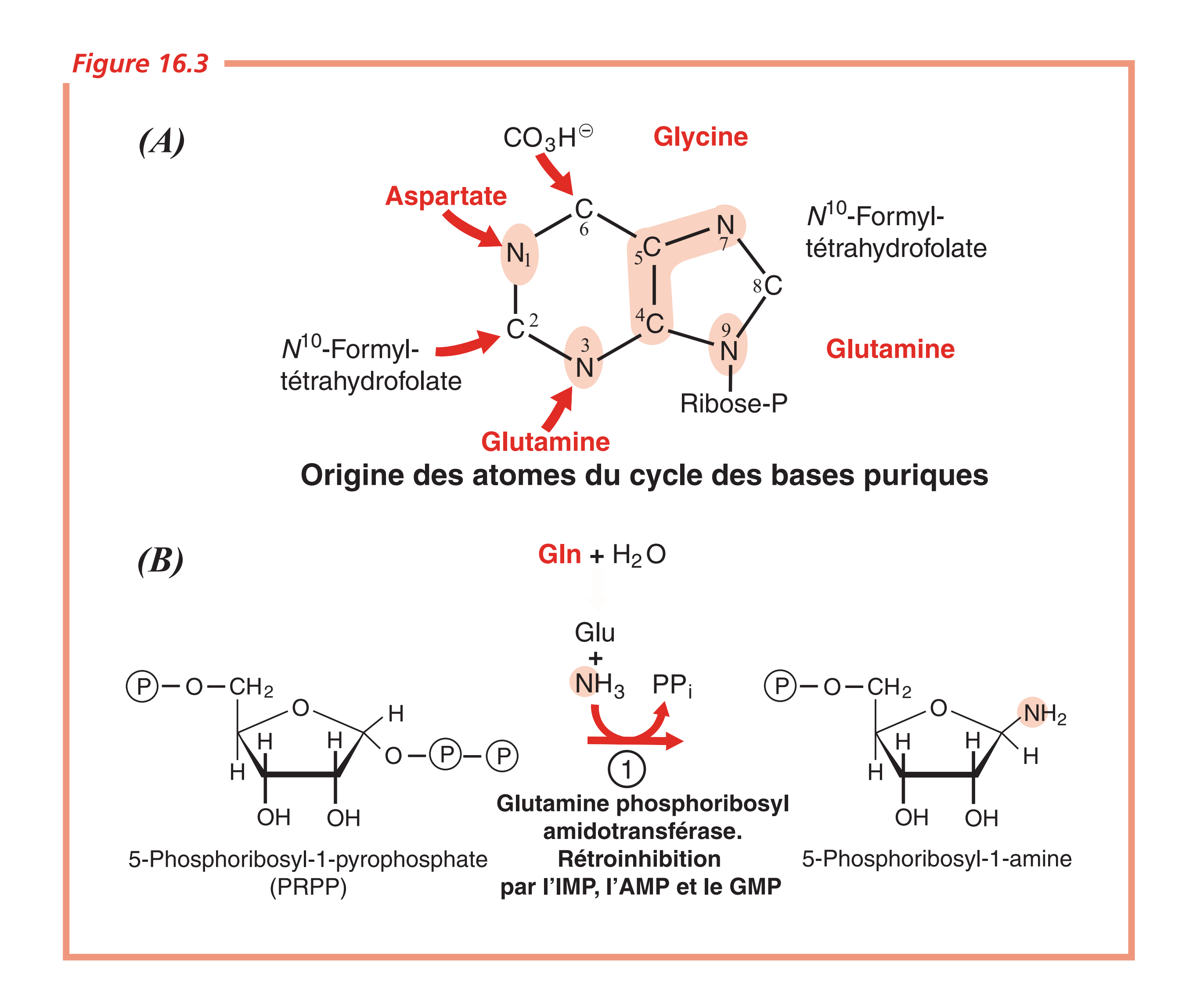
SYNTHÈSE *DE NOVO* DES RIBONUCLÉOTIDES PURIQUES

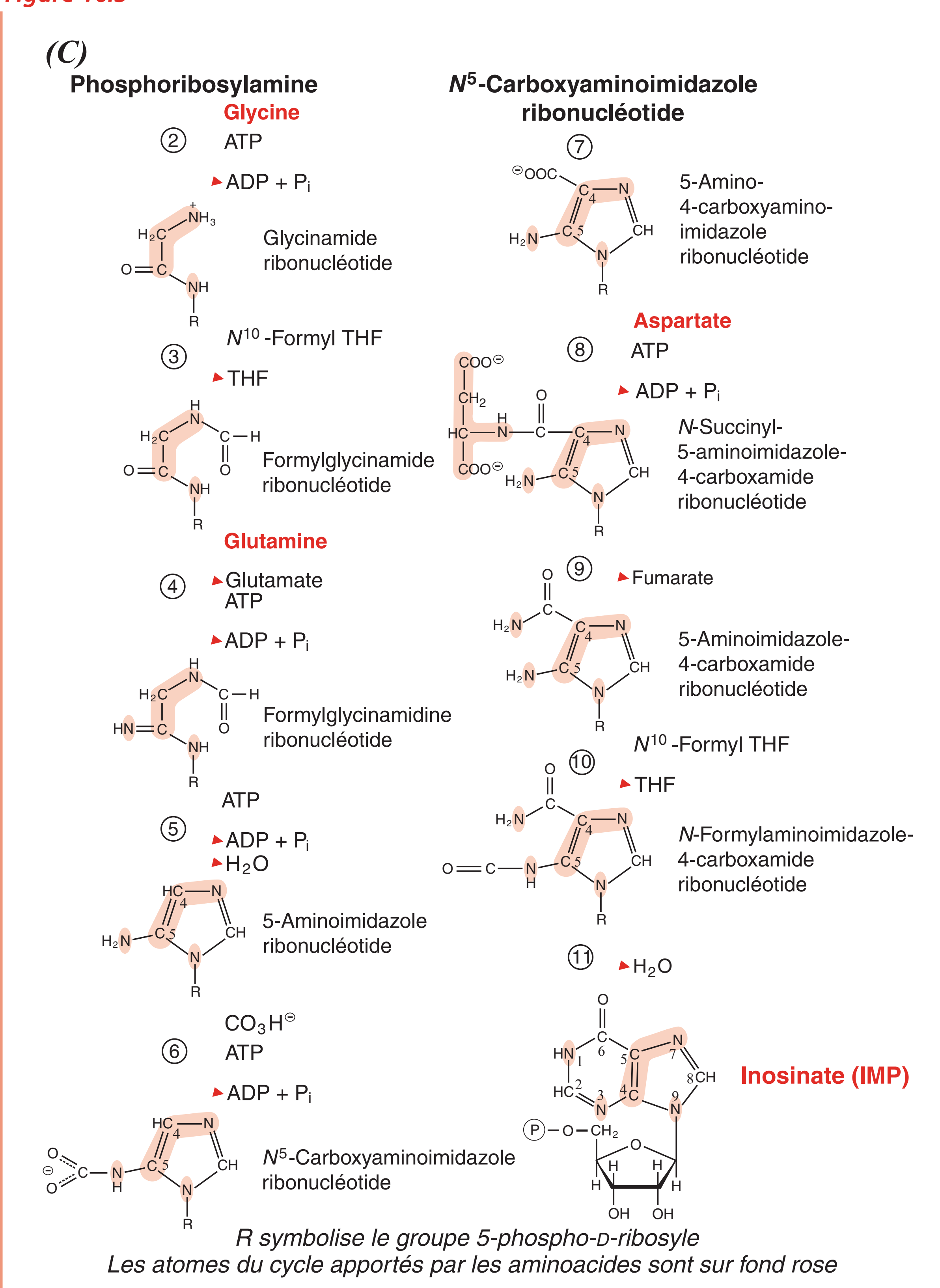
Dans la synthèse *de novo* des ribonucléotides puriques, le cycle purique est élaboré élément après élément sur le PRPP (*Figure 16.3A*).

Au cours d'une première étape (*Figure 16.3B*), l'ammoniac résultant de l'hydrolyse de la glutamine se fixe sur le PRPP pour former la 5-phosphorybosyl-1-amine. Cette réaction, qui engage la voie de biosynthèse, est catalysée par la glutamine phosphoribosyl amidotransférase, enzyme allostérique constitué de deux domaines qui est un site de contrôle par rétroinhibition de la voie de biosynthèse des ribonucléotides puriques.

Puis le cycle purique s'édifie progressivement sur cette structure (*Figure 16.3C*) au cours d'étapes dont la plupart font appel à un mécanisme consistant en l'activation par phosphorylation d'un oxygène lié à un carbone suivie de l'attaque nucléophile du groupe phosphoryle par l'ammoniac ou une amine. Les enzymes correspondants possèdent des domaines de fixation de l'ATP homologues de celui de la carbamyl phosphate synthétase ; chez les Eucaryotes, ils sont organisés en complexes multienzymatiques.

Figure 16.3





R symbolise le groupe 5-phospho-D-ribosyle
Les atomes du cycle apportés par les aminoacides sont sur fond rose

L'inosinate (IMP) qui résulte de la voie précédemment décrite conduit ensuite aux nucléotides adényliques (AMP, ATP) ou guanyliques (GMP, GTP) (*Figure 16.4*). Les voies qui partent de l'inosinate sont des sites de rétroinhibition.

LES DÉSOXYRIBONUCLÉOTIDES SONT SYNTHÉTISÉS PAR RÉDUCTION DES RIBONUCLÉOTIDES

Les désoxyribonucléotides précurseurs du DNA se forment par réduction des ribonucléosides diphosphate ou triphosphate correspondants. Le groupe hydroxyle en C-2' du ribose est remplacé par un atome d'hydrogène et le NADPH est le réducteur ultime. La réaction est catalysée par une ribonucléotide réductase active sur les quatre ribonucléotides. L'étude de la structure tridimensionnelle des ribonucléotides réductases de différentes espèces a montré que ces enzymes sont homologues et qu'ils présentent tous un même mécanisme de réaction faisant intervenir un radical libre tyrosyle stable très inhabituel. Ce dernier capte un électron d'un résidu cystéine du site actif pour créer un radical thiyle très réactif capable d'arracher un atome d'hydrogène du C-3' du ribose ; le radical en C-3' ainsi créé provoque l'élimination de l'hydroxyle du C-2' (*Figure 16.5*).

LE THYMIDYLATE EST SYNTHÉTISÉ PAR MÉTHYLATION DU DÉSOXYURIDYLATE

Le thymidylate (TMP) nécessaire à la synthèse du DNA est obtenu par méthylation du désoxyuridylate (dUMP) au cours d'une réaction catalysée par la thymidylate synthase où le donneur du groupe méthyle est le N^5, N^{10}-méthylènetétrahydrofolate (*Figure 16.6*).

Le N^5, N^{10}-méthylènetétrahydrofolate est régénéré par l'action de la dihydrofolate réductase avec utilisation du NADPH comme réducteur :

$$\text{Dihydrofolate} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{Dihydrofolate réductase}} \text{tétrahydrofolate} + \text{NADP}^+$$

Les deux enzymes, thymidylate synthase et dihydrofolate réductase, qui peuvent être inhibés spécifiquement par le fluorouracile et l'aminoptérine ou le méthotrexate, respectivement, sont des cibles de choix pour la chimiothérapie de certains cancers (p. 146).

Figure 16.4

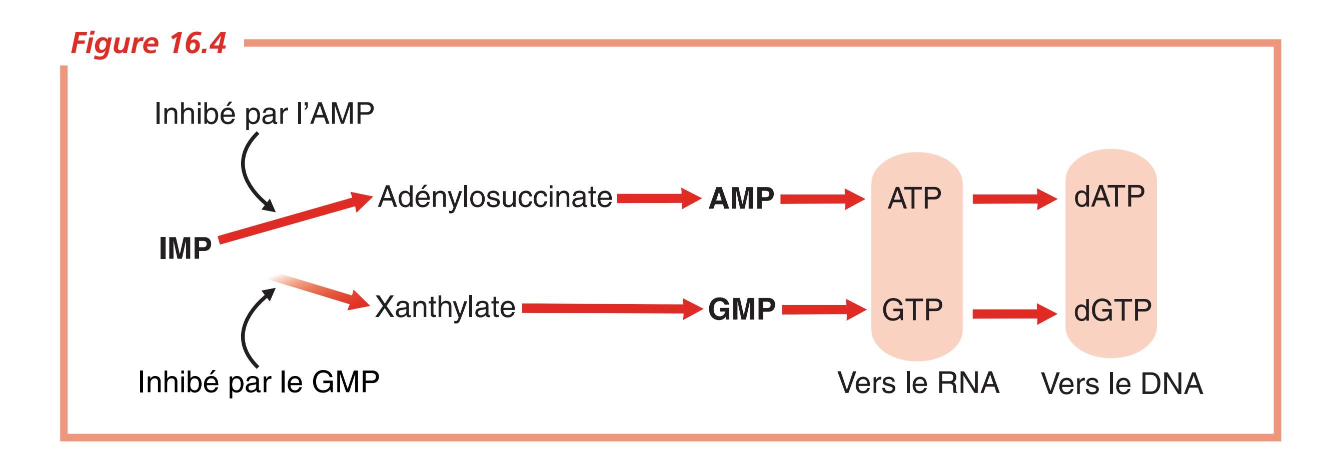


Figure 16.5

Figure 16.6

dUMP

Thymidylate synthase

N^5,N^{10}- **Méthylènetétrahydrofolate**

TMP

Dihydrofolate

RECYCLAGE DES BASES NUCLÉOTIDIQUES

Les bases puriques et, dans une certaine mesure, les bases pyrimidiques libérées par hydrolyse lors du turnover métaboliques des nucléotides et des acides nucléiques peuvent être recyclées grâce à la mise en œuvre de voies de récupération. Un tel processus permet à la plupart des organismes d'économiser de l'énergie et de gérer au mieux l'ammoniac, les aminoacides et les bases nucléotidiques disponibles, ce qui est souvent crucial car ces composés azotés sont en général assez rares dans l'environnement et doivent être préservés.

Deux enzymes, l'adénine phosphoribosyltransférase et l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) fixent les bases puriques au PRPP pour former des nucléosides monophosphtates au cours d'une réaction analogue à celle de la formation de l'orotidylate (*Figure 16.7A*).

Des voies de récupération semblables sont présents dans certains organismes pour les pyrimidines.

SYNTHÈSE DU NAD+, DU NADP+, DU FAD ET DU COENZYME A

Les nucléotides sont des constituants non seulement du RNA et du DNA, mais aussi d'importants coenzymes, le NAD^+, le $NADP^+$, le FAD et le CoA qui sont formés par le transfert de la partie AMP de l'ATP au groupe phosphate d'un composé vitaminique phosphorylé.

Le NAD^+ et le $NADP^+$ sont synthétisés à partir du nicotinate ribonucléotide résultant de l'union du nicotinate, ou vitamine B_6 (p. 123), et du PRPP. L'ATP transfère un groupe AMP au nicotinate ribonucléotide pour former le désamido-NAD^+ qui est ensuite amidifié par la glutamine (*Figure 16.7B*). Le $NADP^+$ dérive du NAD^+ par phosphorylation du groupe 2'-hydroxyle sous l'action de la NAD^+ kinase.

Le FAD est synthétisé à partir de la riboflavine, ou vitamine B_2 (p. 123), et de deux molécules d'ATP (*Figure 16.7C*).

La partie AMP du CoA provient, elle aussi, de l'ATP.

Figure 16.7

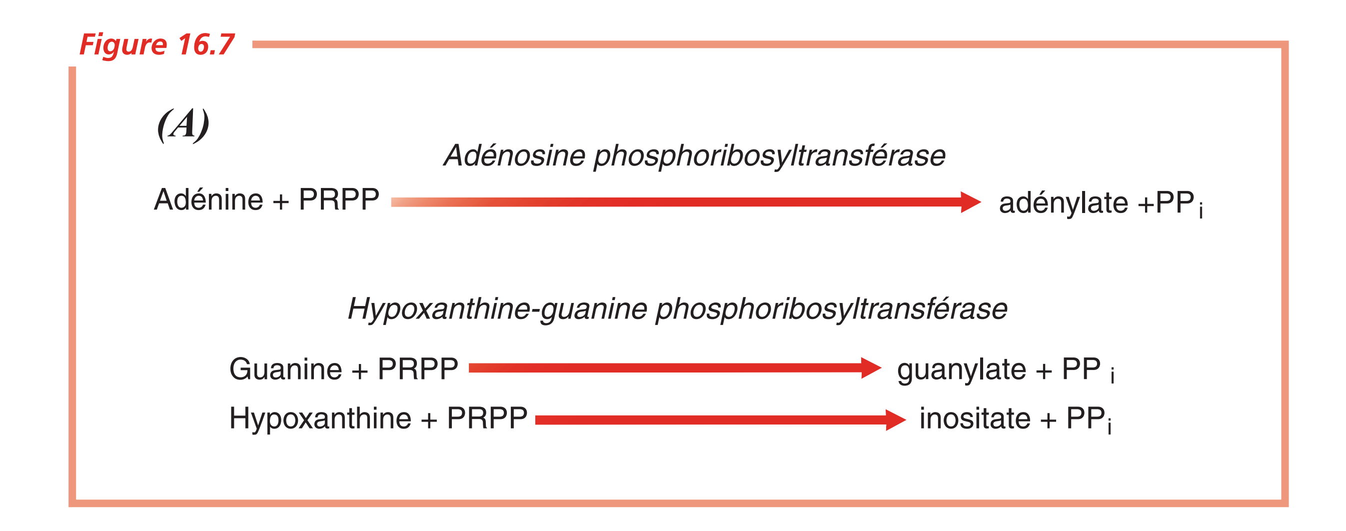


Figure 16.7

(B)

$COO^{\ominus}$

$\overset{+}{N}$
H

Nicotinate

PRPP

PP_i

$COO^{\ominus}$

Ⓟ–O–CH_2

O

$\overset{+}{N}$

HO OH

Nicotinate ribonucléotide

ATP

PP_i

$COO^{\ominus}$

Adénine

Ribose – Ⓟ – Ⓟ – ribose

Désamido NAD⁺

Gln

Glu

O

C

NH_2

Adénine

Ribose – Ⓟ – Ⓟ – ribose

NAD⁺

(C)

H_3C

H_3C

N 5

O

4

3 NH

2

O

1 N

10 N

6 7 8 9

CH_2

CHOH

CHOH

CHOH

CH_2OH

Riboflavine

ATP

ADP

Riboflavine 5'-phosphate

ATP

PP_i

H_3C

H_3C

N

O

NH

N

O

N

CH_2

HCOH

HCOH

HCOH

Adénine

Ribose – Ⓟ – Ⓟ –ribose — CH_2

Flavine adénine dinucléotide (FAD)

DÉGRADATION DES PURINES

Le renouvellement des cellules s'accompagne de celui des nucléotides qui sont hydrolysés par des nucléotidases. Les purines non réutilisées par les voies de récupération sont transformées en composés qui puissent être excrétés. Chez l'Homme, elles sont dégradées en acide urique sous l'action d'une flavoprotéine contenant du fer et du molybdène, la xanthine oxydase (*Figure 16.8A*). L'activité de cet enzyme peut être bloquée par un inhibiteur, l'allopurinol (*Figure 16.8B*), largement utilisé en thérapeutique en cas d'hyperproduction d'acide urique, comme c'est le cas dans la goutte ou les syndromes myéloprolifératifs.

SYNDROME DE LESCH-NYHAN

Une mutation dans le gène qui code pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) se traduit par une absence de cet enzyme. Chez les sujets affectés, cette erreur innée du métabolisme se traduit dès l'enfance par une concentration élevée de PRPP, une vitesse accrue de la synthèse des purines par la voie *de novo*, une accumulation d'intermédiaires à des taux anormaux et une surproduction d'acide urique. Les enfants qui en sont atteints présentent le syndrome de Lesch-Nyhan caractérisé par un comportement autodestructeur compulsif (morsure des doigts et des lèvres), un comportement agressif envers les autres, un retard psychique et une spasticité, et enfin un tableau clinique de goutte.

Bien que la relation entre l'absence de transférase et les signes neurologiques ne soit pas encore élucidée, le syndrome de Lesch-Nyhan met bien en évidence l'importance de la voie de récupération pour la synthèse de l'IMP et du GMP.

Figure 16.8

(A)
AMP
IMP
Guanine
Hypoxanthine
O_2 + H_2O
H_2O_2
Xanthine oxydase
Xanthine
Xanthine oxydase
H_2O + O_2
H_2O_2
H^+
Urate
Acide urique
(B)
OH
Allopurinol

Chapitre 17

Biosynthèse des lipides membranaires et des stéroïdes

Les lipides jouent de nombreux rôles au sein des cellules. Si les triglycérides représentent, sous une forme condensée, les principales réserves d'énergie mise à la disposition des cellules, comme nous l'avons établi au chapitre 9, les phospholipides, les sphingolipides et le cholestérol sont les constituants essentiels des membranes biologiques, comme nous l'avons constaté au chapitre 4. Il est donc essentiel pour l'autonomie des organismes vivants de pouvoir synthétiser ces lipides complexes à partir de molécules relativement simples telles que le phosphatidate, le céramide ou l'acétate.

La voie par laquelle est synthétisé le cholestérol est importante en raison du rôle joué par ce dernier au niveau des membranes mais aussi des fonctions biologiques cruciales de certains de ses dérivés, tels que les sels biliaires qui interviennent dans la formation de micelles avec les triglycérides au niveau de l'intestin, les hormones stéroïdes sexuelles ou corticosurrénales qui participent à la régulation de nombre de processus biologiques majeurs et la vitamine D qui joue un rôle crucial dans le métabolisme du calcium.

Comme toutes les voies de biosynthèses, les séquences qui conduisent à la formation des lipides complexes nécessitent un apport d'énergie sous forme d'ATP et de pouvoir réducteur sous forme de NADPH, mais aussi de précurseurs activés tels que le CDP-diacylglycérol ou l'acétyl CoA, entres autres.

Enfin, certains dérivés lipidiques sont spécialisés dans les fonctions de pigments tels que le rétinal ou le carotène ou de messagers cellulaires tels que les eicosanoïdes et les dérivés du phosphatidyl inositol. Là encore, une biosynthèse autonome est essentielle à la vie de la cellule.

BIOSYNTHÈSE DES TRIACYLGLYCÉROLS ET DES GLYCÉROPHOSPHOLIPIDES

Les triacylglycérols destinés à la mise en réserve d'énergie et les glycérophospholipides destinés aux membranes sont synthétisés à partir des mêmes précurseurs : le L-glycérol 3-phosphate et des acyl CoA gras dont l'union conduit à un lysophosphatidate, puis à un phosphatidate (*Figure 17.1A*) ; ces acylations sont catalysées par une glycérol phosphate acyl transférase. Le L-glycérol 3-phosphate vient de la réduction d'un intermédiaire de la glycolyse, le dihydroxyacétone phosphate, par la glycérol 3-phosphate déshydrogénase, ou encore de la phosphorylation du glycérol par la glycérol kinase. Les acyl CoA gras, formes activées des acides gras, résultent de l'action des acyl CoA synthétases (p. 196). L'étape suivante dans la biosynthèse des triacylglycérols et des glycérophospholipides est la déphosphorylation du phosphatidate catalysée par une phosphatase spécifique pour donner un 1,2-diacylglycérol (DAG). À partir de ce dernier, les voies de biosynthèse des triacylglycérols et des glycérophospholopides divergent.

Pour la synthèse des triacylglycérols, les 1,2-diacylglycérols (DAG) sont convertis en triacylglycérols par la transestérification d'un troisième acyl CoA gras ; la réaction est catalysée par une diglycéride acyltransférase (*Figure 17.1B*). La synthèse s'effectue essentiellement dans le foie où la phosphatase et l'acyltransférase sont associées dans un complexe triacylglycérol synthétase situé dans la membrane du réticulum endoplasmique. Cette synthèse est sous la dépendance de plusieurs hormones : l'insuline, qui favorise la conversion des glucides en triacylglycérols, mais aussi le glucagon, les hormones corticosurrénales et l'hormone de croissance, entre autres.

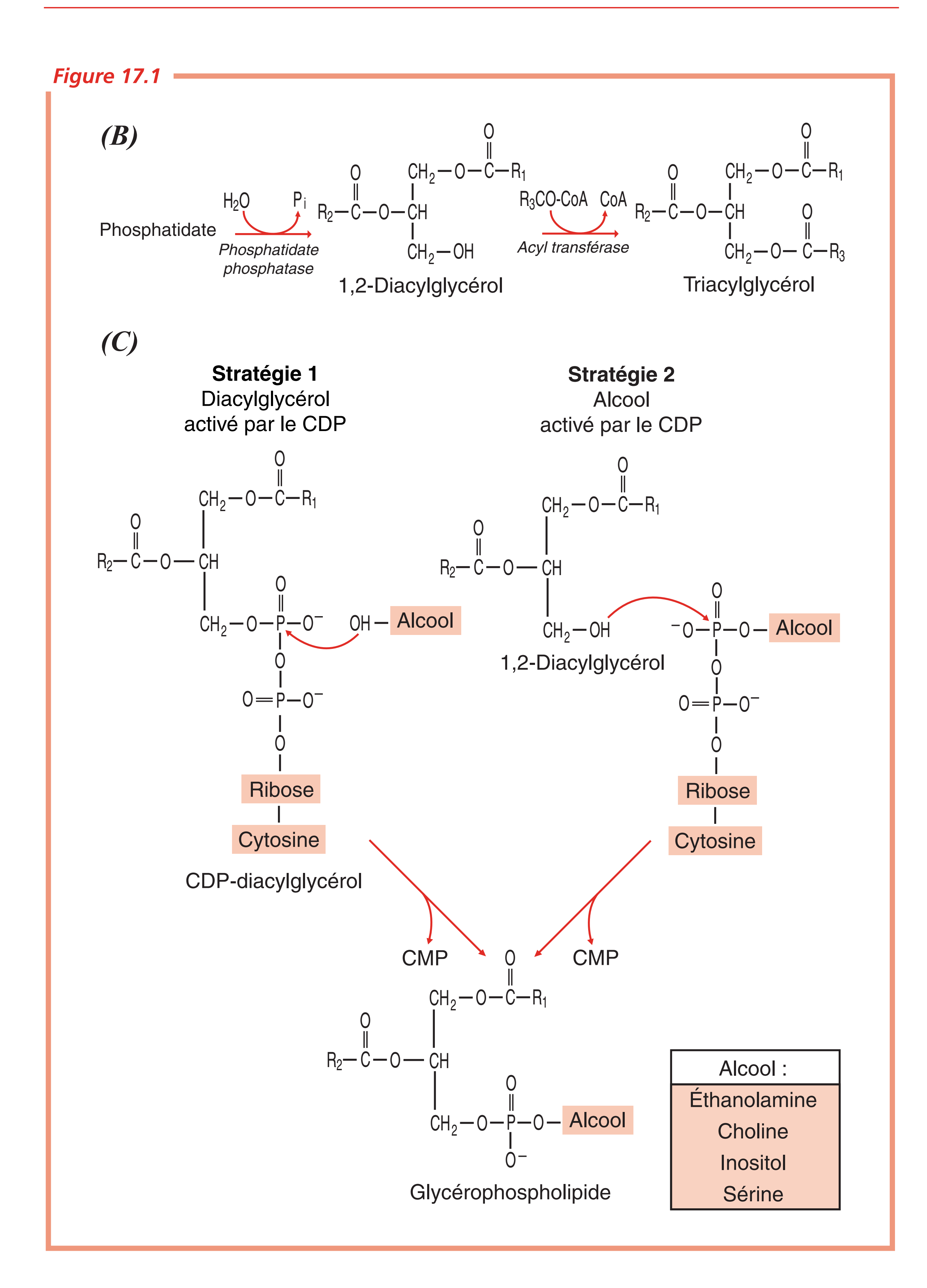
Pour la synthèse des glycérophospholipides, où un diacylglycéride et un alcool sont unis par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester, l'un des composants doit être activé. Selon une première stratégie, un phosphatidate réagit avec le CTP pour former un CDP-diacylglycérol ; cette forme activée est alors susceptible d'estérifier un alcool tel que la sérine ou l'inositol (*Figure 17.1C*). Dans une seconde stratégie, un alcool sous forme activée, la CDP-éthanolamine ou la CDP-choline, par exemple, est transféré à un diacylglycérol pour former la phosphatidyl éthanolamine ou la phosphatidyl choline (*Figure 17.1C*).

Figure 17.1

(A)

$R_1CO\text{-}CoA$ → CoA (Acyl transférase); $R_2CO\text{-}CoA$ → CoA (Acyl transférase)

L-Glycérol 3 -phosphate — Lysophosphatidate — Phosphatidate


Figure 17.1
(B)
Phosphatidate
H2O
Pi
Phosphatidate phosphatase
1,2-Diacylglycérol
R3CO-CoA
CoA
Acyl transférase
Triacylglycérol
(C)
Stratégie 1
Diacylglycérol activé par le CDP
Alcool
Ribose
Cytosine
CDP-diacylglycérol
Stratégie 2
Alcool activé par le CDP
1,2-Diacylglycérol
Alcool
Ribose
Cytosine
CMP
CMP
Alcool
Glycérophospholipide
Alcool :
Éthanolamine
Choline
Inositol
Sérine

BIOSYNTHÈSE DES SPHINGOLIPIDES

La biosynthèse des sphingolipides passe par la création d'un céramide qui permet ensuite la formation d'une sphingomyéline ou d'un cérébroside. La synthèse du céramide (*Figure 17.2A*) fait intervenir trois étapes : synthèse d'une amine en C_{18}, la sphinganine, à partir du palmityl CoA et de la sérine ; amidification par un acide gras de longueur et de degré d'insaturation variables, ce qui conduit à une *N*-acylsphinganine ; désaturation de la partie sphinganine de cet amide avec création d'une double liaison et formation d'une *N*-acylsphingosine ou céramide.

La réaction du céramide avec la phosphatidylcholine (*Figure 17.2B*) forme une sphingomyéline (p. 84), constituant de la gaine de myéline qui entoure les fibres nerveuses.

La réaction du céramide avec l'UDP-glucose ou l'UDP-galactose (*Figure 17.2B*) conduit à un cérébroside (p. 84).

Les gangliosides (p. 84), sphingolipides complexes où une chaîne oligosaccharidique contenant au moins un ose acide (*N*-acétylneuraminate ou *N*-glycolylneuraminate), sont synthétisés par l'addition successive et ordonnée de résidus osidiques activés au céramide.

Figure 17.2

(B)

Céramide
UDP-glucose
UDP
Phosphatidylcholine
1,2-Diacylglycérol
Cérébroside
Sphingomyéline
Gangliosides
Oses activés
Cérébroside
Sphingomyéline

Figure 17.2

(A)

CH_2OH
$H_3\overset{\oplus}{N}—CH$
$COO^{\ominus}$
Sérine
$CoA\text{-}S—C(=O)—(CH_2)_{14}—CH_3$
Palmityl CoA
3-Cétosphinganine synthase
$H^{\oplus}$
CO_2
CoA-SH
CH_2OH
$H_3\overset{\oplus}{N}—CH$
$C(=O)—(CH_2)_{14}—CH_3$
β-Cétosphinganine
3-Cétosphinganine réductase
NADPH + $H^{\oplus}$
$NADP^{\oplus}$
$^1CH_2OH$
$H_3\overset{\oplus}{N}—^2CH$
$^3CH—(CH_2)_{14}—CH_3$
OH
Sphinganine
Acyltransférase
Acyl CoA
CoA
$^1CH_2OH$
$R—C(=O)—HN—^2CH$
$^3CH—(CH_2)_{14}—CH_3$
OH
***N*-Acylsphinganine**
Mono-oxygénase à fonction mixte
$^1CH_2OH$
$R—C(=O)—HN—^2CH$
$^3CH—CH=CH—(CH_2)_{12}—CH_3$
OH
Céramide contenant de la sphingosine
Céramide
R
O
N
H
H
1
2
3
H
OH
H
H
$(CH_2)_{12}$
CH_3

BIOSYNTHÈSE DU CHOLESTÉROL

Chez les Vertébrés, le cholestérol est synthétisé dans le foie à partir de l'acétyl CoA cytosolique ; certains atomes du squelette carboné du cholestérol sont apportés par le groupe méthyle, d'autres par le groupe carboxyle (*Figure 17.3A*).

Le processus biosynthétique évolue en trois phases : condensation de trois acétyl CoA en mévalonate suivie de la conversion de ce dernier en isopentényl pyrophosphate ; condensation de six isopentényl pyrophosphate en squalène ; cyclisation du squalène avec formation du squelette carboné tétracyclique caractéristique des stérols et des stéroïdes.

$$\text{Acétate } (C_2) \rightarrow \text{Isoprène activé } (C_5) \rightarrow \text{Squalène}(C_{30}) \rightarrow \text{Cholestérol } (C_{27})$$

Synthèse du mévalonate et de l'isopentényl pyrophosphate

La synthèse du mévalonate (*Figure 17.3B*) s'effectue dans le cytosol à partir de trois acétyl CoA importés des mitochondries. Lors d'une première réaction catalysée par une thiolase, deux acétyl CoA se condensent pour donner l'acétoacétyl CoA. Ce dernier réagit avec un troisième acétyl CoA pour former le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA (HMG-CoA) au cours d'une seconde réaction catalysée par l'HMG-CoA synthase cytosolique ; cet enzyme est différent de l'enzyme mitochondrial qui intervient dans la formation des corps cétoniques à partir de l'acétyl CoA (p. 194). Dans une troisième réaction, l'HMG-CoA est réduit en mévalonate, aux dépens de deux NADPH, par l'HMG-CoA réductase, protéine intégrale de la membrane du réticulum endoplasmique lisse. Cette réaction irréversible, qui engage l'HMG-CoA dans la formation du cholestérol, est le point de régulation essentiel de la voie de biosynthèse de ce composé (p. 330).

À la suite de trois phosphorylations et une décarboxylation, le mévalonate est converti en Δ^3-isopentényl pyrophosphate en équilibre avec son isomère, le diméthylallyl pyrophosphate (*Figure 17.3C*). Le Δ^3-isopentényl pyrophosphate, unité isoprénique activée, est le module de base pour la biosynthèse du cholestérol, mais aussi de nombre de molécules biologiquement importantes.

Figure 17.3

(C)

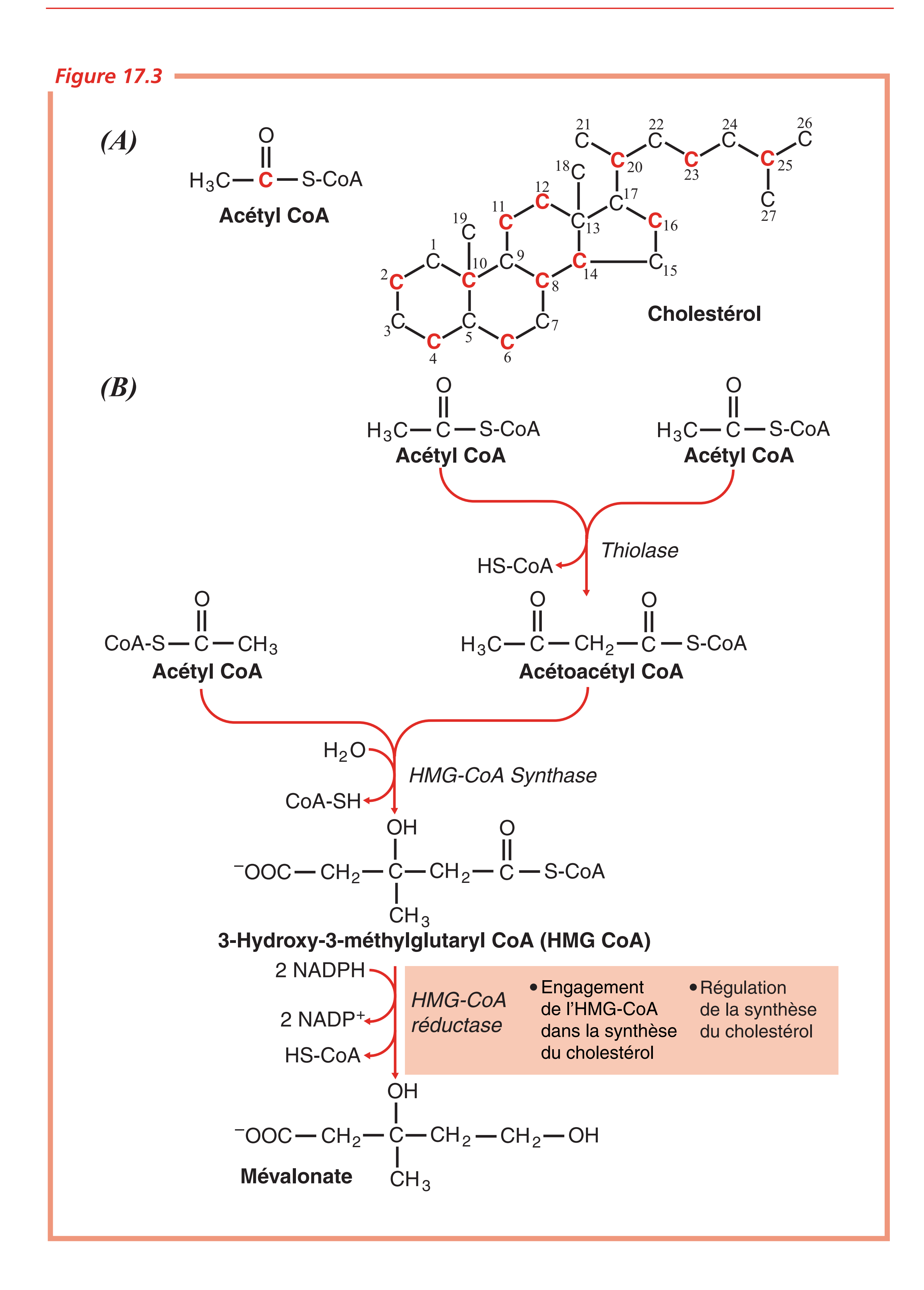
3-Phospho-5-pyrophosphomévalonate

CO_2, P_i

Δ^3-Isopentényl pyrophosphate

Isoprènes activés

Diméthylallyl pyrophosphate


Figure 17.3
(A)
H3C—C—S-CoA
Acétyl CoA
Cholestérol
(B)
Acétyl CoA
Acétyl CoA
Thiolase
HS-CoA
Acétyl CoA
Acétoacétyl CoA
H2O
HMG-CoA Synthase
CoA-SH
3-Hydroxy-3-méthylglutaryl CoA (HMG CoA)
2 NADPH
2 NADP+
HS-CoA
HMG-CoA réductase
• Engagement de l'HMG-CoA dans la synthèse du cholestérol
• Régulation de la synthèse du cholestérol
Mévalonate

Condensation de six molécules d'isopentényl pyrophosphate en squalène

Un isopentényl pyrophosphate et un diméthylallyl pyrophosphate se condensent tête-à-queue pour former le géranyl pyrophosphate en C_{10} ; une seconde condensation tête-à-queue avec un autre isopentényl pyrophosphate conduit au farnésyl pyrophosphate en C_{15}. Enfin, deux molécules de farnésyl pyrophosphate s'unissent tête-à-tête pour donner le squalène en C_{30} (*Figure 17.4*).

Cyclisation du squalène et formation du noyau stéroïdique

La squalène mono-oxygénase fixe l'un des atomes d'oxygène d'une molécule de O_2 à l'extrémité de la chaîne carbonée du squalène, ce qui conduit au squalène 2,3-époxyde dont la disposition des doubles liaisons le long de la chaîne carbonée linéaire permet une cyclisation et la formation d'un noyau tétracyclique caractéristique des stérols animaux ou végétaux ainsi que des stéroïdes (*Figure 17.5*).

Figure 17.5

Figure 17.4

Diméthylallyl pyrophosphate

PP_i

Isopentényl pyrophosphate

Géranyl transférase

$H^{\oplus}$

Géranyl pyrophosphate (C_{10})

Isopentényl pyrophosphate (C_5)

Géranyl transférase

PP_i

Farnésyl pyrophosphate (C_{15})

Farnésyl pyrophosphate (C_{15})

Squalène synthase

NADPH

PP_i

$NADP^+$

Squalène (C_{30})

RÉGULATION DE LA BIOSYNTHÈSE DU CHOLESTÉROL

La synthèse du cholestérol s'effectue essentiellement dans le foie, mais aussi dans l'intestin. Elle dépend de la concentration du cholestérol intracellulaire lui-même ; la régulation s'effectue essentiellement au niveau de l'HMG-CoA réductase dont le taux et l'activité sont contrôlés de plusieurs façons (*Figure 17.6*).

La vitesse de la synthèse du mRNA de l'HMG-CoA réductase est contrôlée par la SREBP (de *sterol regulatory element binding protein*), facteur de transcription qui se lie à une séquence du DNA du gène de la réductase appelée SRE (de *sterol regulatory element*). Dans sa forme inactive, la SREBP est accrochée au réticulum endoplasmique ou à la membrane nucléaire. Lorsque le taux du cholestérol intracellulaire diminue, elle est libérée et elle migre vers le noyau où elle se fixe sur le SRE du gène de l'HMG-CoA réductase ; elle active alors la transcription. En revanche, lorsque le taux du cholestérol intracellulaire s'élève, la libération de la SREBP est inhibée et la SREBP nucléaire est protéolysée.

L'activité de l'HMG-CoA réductase est régulée hormonalement. L'HMG-CoA réductase peut se présenter sous une forme non phosphorylée active ou phosphorylée inactive. Le glucagon provoque la phosphorylation, et donc l'inactivation de l'enzyme, tandis que l'insuline déclenche la déphosphorylation, et donc l'activation de l'enzyme.

Enfin, l'activité de l'HMG-CoA réductase est inhibée compétitivement par des analogues structuraux du mévalonate dénommés statines. Ces composés, initialement extraits de champignons et actuellement obtenus par synthèse, sont très largement utilisés dans le traitement de l'hypercholestérolémie. En effet, une hyperproduction non contrôlée de cholestérol conduit à une accumulation de ce dernier dans les vaisseaux sanguins et il en résulte des plaques d'athérosclérose à l'origine d'infarctus du myocarde ou d'hémorragies cérébrales.

LES TRIGLYCÉRIDES ET LE CHOLESTÉROL SONT TRANSPORTÉS PAR DES LIPOPROTÉINES

Le cholestérol et les triglycérides sont transportés par le sang d'un organe à un autre sous forme de lipoprotéines. Les lipoprotéines se présentent comme des complexes macromoléculaires constitués par un core de lipides hydrophobes entouré d'une couche de lipides plus polaires, essentiellement des phospholipides, et de protéines dénommées apoprotéines ; ces dernières ont pour fonction première de solubiliser les lipides mais, de plus, elles possèdent des signaux d'adressage cellulaire. Dix apoprotéines ont été caractérisées ; elles sont synthétisées par le foie et l'intestin. Les particules lipoprotéiques sont classées par densité croissante : chylomicrons, résidus de chylomicrons, lipoprotéines de très faible densité (VLDL), lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), lipoprotéines de faible densité (LDL), lipoprotéines de haute densité (*Tableau 17.1*). Chaque classe de lipoprotéines a une fonction spécifique au sein des organismes vivants.

Figure 17.6

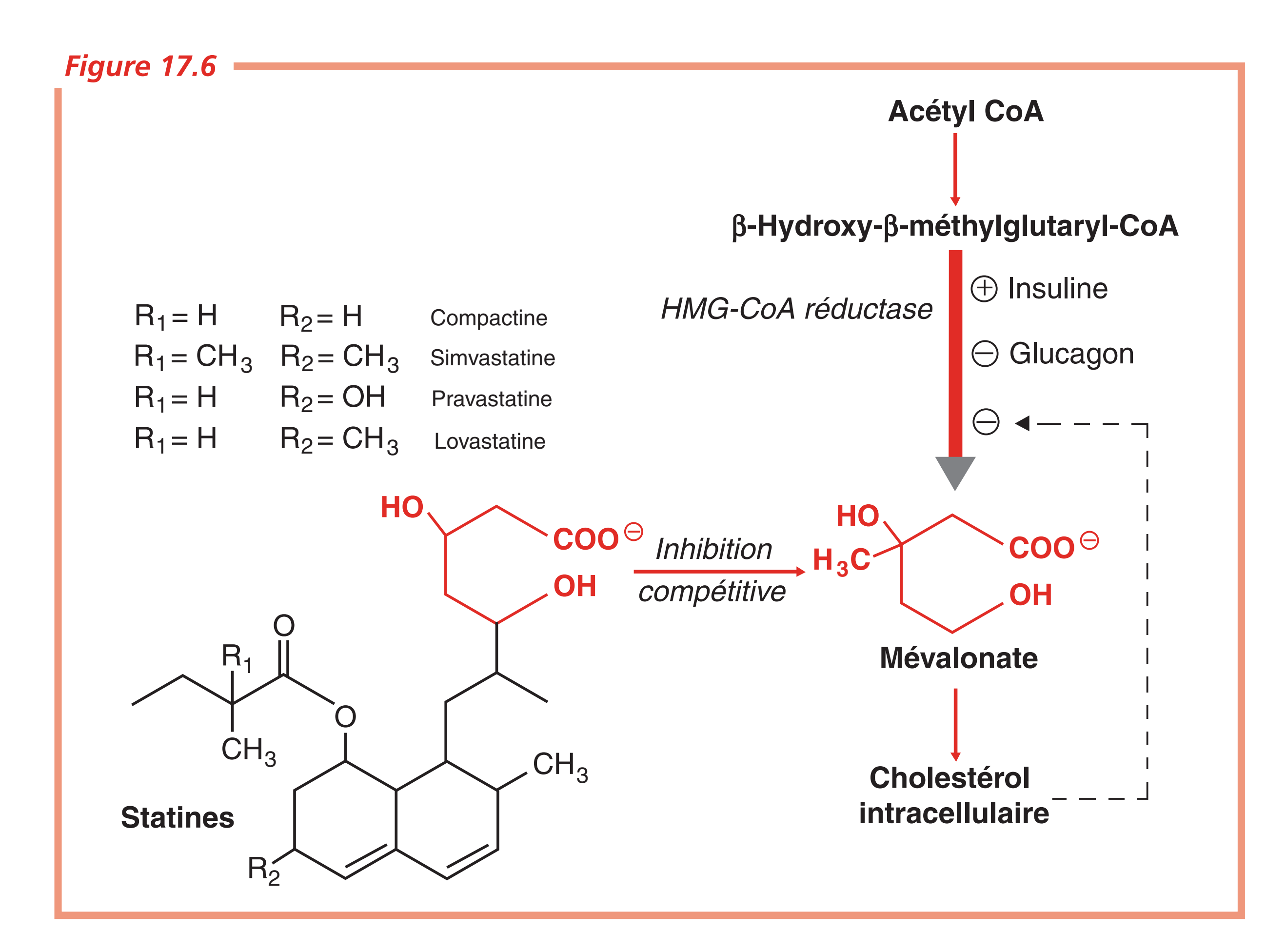


Tableau 17.1

Propriétés des lipoprotéines plasmatiques

Lipoprotéines	Principaux lipides du core	Apoprotéines	Mécanisme de délivrance des lipides
Chylomicron	Triacylglycérols alimentaires	B-48, C,E	Hydrolyse par la lipoprotéine lipase
Résidu de chylomicrons	Esters de cholestérol alimentaires	B-48, E	Endocytose médiée par un récepteur au niveau du foie
Lipoprotéine de très faible densité (VLDL)	Triacylglycérols endogènes	B-100, C,E	Hydrolyse par la lipoprotéine lipase
Lipoprotéine de densité intermédiaire (IDL)	Esters de cholestérol endogènes	B-100, E	Endocytose médiée par un récepteur au niveau du foie et conversion en LDL
Lipoprotéine de faible densité (LDL)	Esters de cholestérol endogènes	B-100	Endocytose médiée par un récepteur au niveau du foie et d'autres tissus
Lipoprotéine de haute densité (HDL)	Esters de cholestérol endogènes	A	Transfert des esters de cholestérol aux IDL et LDL

DÉRIVÉS DU CHOLESTÉROL

Sels biliaires

Les sels biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol, stockés et concentrés dans la vésicule biliaire, puis libérés dans l'intestin grêle. Le cholestérol est converti en trihydroxycoprostanoate puis en un intermédiaire activé, le cholyl CoA, dont le carboxyle est ensuite amidifié par la glycine ($H_2N\text{-}CH_2\text{-}COO^-$) ou la taurine ($H_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2SO_3^-$) pour former le glycocholate ou le taurocholate, respectivement (*Figure 17.7A*). Les sels biliaires en tant que dérivés polaires sont des détergents qui solubilisent les lipides présents dans la lumière intestinale dont ils facilitent donc l'hydrolyse par les lipases et l'absorption par les cellules intestinales (p. 190).

Hormones stéroïdes

Les hormones stéroïdes sont toutes synthétisées à partir du cholestérol par l'intermédiaire de la prégnénolone et de la progestérone (*Figure 17.7B*). La chaîne latérale du cholestérol est tout d'abord clivée entre les carbones C-20 et C-22, ce qui conduit à la prégnénolone qui est ensuite convertie en progestérone par oxydation de l'hydroxyle 3β en carbonyle et isomérisation de la double liaison Δ^5 en Δ^4 ; la présence d'un groupe Δ^4-3-céto dans le cycle A est commune à toutes les hormones stéroïdes sauf aux œstrogènes dont le cycle A aromatique résulte de l'action subséquente d'une aromatase. Les différentes hormones stéroïdes sont ensuite formées par des hydroxylations successives au niveau des carbones C-17, C-21 ou C-11 (*Figure 17.7C*) ; ces dernières sont catalysées par des oxygénases à fonction mixte qui font appel au NADPH, à O_2 et au cytochrome P-450 ; la 11β-hydroxylation est spécifique des hormones corticosurrénales.

Figure 17.7

A

Cholestérol

Trihydroxy-coprostanoate

Cholyl CoA

Glycocholate

Taurocholate

Figure 17.7

B

Cholestérol

Oxygénase à fonction mixte

OH OH H_3C CH_3 CH_3 CH_3

20α, 22β-Dihydroxy-cholestérol

Desmolase

H_3C O CH_3 17 CH_3 3 HO

Prégnénolone

H_3C O CH_3 CH_3 5 4 O

Progestérone

C

Progestérone

H_3C O CH_3 OH 17 CH_3 O

17α-Hydroxyprogestérone

CH_3 O CH_3 O

Androsténedione

CH_3 OH CH_3 O

Testostérone

Aromatase

CH_3 O HO

Œstrone

Aromatase

CH_3 OH HO

Œstradiol

Progestérone

HOH_2C O CH_3 OH HO CH_3 O

Cortisol

HOH_2C O CH_3 HO 11 CH_3 O

Corticostérone

HOH_2C O O C H HO 11 18 17 CH_3 O

Aldostérone

Les synthèses sont effectuées dans les cellules spécialisées des glandes endocrines stéroïdogènes : (1) les cellules de Leydig du testicule pour les androgènes (androstènedione, testostérone et dihydrotestostérone) ; (2) le follicule ovarien pour les œstrogènes (œstrone et œstradiol), le corps jaune ovarien pour les progestagènes (progestérone) et (3) les cellules de la corticosurrénale pour les minéralocorticoïdes (corticostérone et aldostérone), les glucocorticoïdes (cortisol) et les androgènes surrénaliens (sulfate de déhydroépiandrostérone).

Les hormones stéroïdes sont sécrétées puis transportées par le sang qui les amène aux tissus où, après avoir passé la membrane plasmique des cellules cible, elles se lient à des récepteurs nucléaires spécifiques ; ces derniers peuvent alors se fixer sur des séquences déterminées du DNA dénommées éléments de réponse aux hormones et activer spécifiquement la transcription de certains gènes qui régulent des métabolismes particuliers (p. 376).

Les hormones stéroïdes dites sexuelles sont les androgènes, les œstrogènes et les progestagènes ; elles sont directement impliquées dans le développement des organes sexuels et le contrôle de la reproduction où elles interviennent à de nombreux stades par des mécanismes complexes. Les androgènes sont à l'origine du développement et de la différentiation du phénotype mâle chez le fœtus et ils sont nécessaires au développement du comportement sexuel mâle, au maintien de la fonction testiculaire et à la maturation des spermatozoïdes, mais ils ont aussi des effets anabolisants qui permettent, entre autres, le développement de la masse musculaire. Les œstrogènes participent au contrôle de la différentiation terminale des cellules folliculaires et les progestagènes à la préparation de la muqueuse utérine à l'implantation de l'embryon et au maintien de la gestation.

Les glucocorticoïdes (1) stimulent la gluconéogenèse et la synthèse du glycogène dans le foie en favorisant la synthèse de la PEP carboxykinase, de la fructose 1,6-bisphosphatase, de la glucose 6-phosphatase et de la glycogène synthase ; (2) inhibent la synthèse des protéines et stimulent leur dégradation dans les tissus périphériques tels que le muscle ; (3) diminuent ou suppriment les réponses inflammatoires ou allergiques en inhibant la libération de l'arachidonate par la phospholipase A_2 et, par conséquent, en empêchant la synthèse des prostaglandines, des thromboxanes et des leukotriènes ; (4) ont un effet immunosuppresseur en inhibant la réplication du DNA et la mitose et en réprimant la formation des anticorps et des lymphocytes et (5) inhibent la formation des fibroblastes, cellules qui participent à la cicatrisation et ralentissent la réparation des fractures osseuses.

Les minéralocorticoïdes participent à la régulation de l'équilibre Na^+-K^+ en contrôlant leur élimination rénale. L'aldostérone accroît la capacité des cellules des tubules rénaux à réabsorber Na^+, Cl^- et H_2O du filtrat glomérulaire.

Figure 17.8

A

7-Déhydrocholestérol

Ultraviolet

Prévitamine D_3

Vitamine D_3 (Cholécalciférol)

Calcitriol (1,25- dihydroxycholécalciférol)

Vitamine D

Le cholestérol est aussi le précurseur de la vitamine D et du calcitriol (*Figure 4.6A*). Au niveau de la peau, le 7-déhydrocholestérol ou provitamine D_3 est photolysé par le rayonnement ultraviolet en prévitamine D_3 qui s'isomérise spontanément en vitamine D_3 ou cholécalciférol ; dans le foie puis dans le rein, ce dernier est hydroxylé en calcitriol, hormone active dans le métabolisme phosphocalcique.

Tout comme les hormones stéroïdes, le calcitriol se lie à un récepteur nucléaire qui, une fois activé, devient un facteur de transcription susceptible de réguler l'expression de gènes spécifiques (p. 376). Ainsi, le calcitriol favorise la synthèse d'une protéine qui se lie au Ca^{2+} et capte ce dernier lorsqu'il est apporté par l'alimentation. Le calcitriol régule le taux de Ca^{2+} dans le rein et dans les os et un déficit en vitamine D se traduit par des malformations osseuses et du rachitisme. Un apport correct de cette vitamine permet de corriger ces troubles.

HORMONES EICOSANOÏDES

Les eicosanoïdes sont de puissantes hormones paracrines dérivées de l'acide arachidonique 20:4 ($\Delta^{5,8,11,14}$) libéré des lipides membranaires par l'action de lipases (*Figure 17.9*). Elles modifient l'activité des cellules qui les ont synthétisées et sécrétées ainsi que celle des cellules proches en se fixant sur des récepteurs 7TM. On en distingue trois groupes : les prostaglandines, les thromboxanes et les leukotriènes.

Les *prostaglandines (PG)*, ainsi dénommées parce qu'elles furent isolées pour la première fois du sperme où l'on croyait qu'elles étaient sécrétées par la prostate, sont en fait synthétisées par la plupart des cellules. Elles présentent dans leur molécule un cycle de cinq atomes de carbone. On en distingue plusieurs sous-groupes, PGA à PGH, caractérisés par leur structure et leurs propriétés physiques et le chiffre qui suit précise le nombre de doubles liaisons entre les atomes de carbone PGA_2, PGH_2,.. L'enzyme prostaglandine endoperoxyde synthase, qui convertit l'arachidonate en prostaglandine PGH_2, a deux activités distinctes : une activité cyclo-oxygénase et une activité hydroperoxydase. La cyclo-oxygénase (COX), qui donc catalyse la première étape de la voie qui conduit de l'arachidonate aux prostaglandines et aux thromboxanes, est le site d'action de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que les dérivés salicylés (aspirine), les dérivés de l'acide phénylpropionique (ibuprofène) et les dérivés anthraniliques (fénamates). Les prostaglandines affectent par l'intermédiaire du cAMP nombre de processus dans des tissus très divers. Certaines prostaglandines stimulent la contraction de l'utérus lors de la menstruation ou de l'accouchement ; d'autres interviennent dans la régulation du flux sanguin de certains organes, de la température corporelle, de la sensibilité à certaines hormones, du cycle veille-sommeil ou encore de l'inflammation et de la douleur.

Les *thromboxanes (TX)*, ainsi dénommés parce qu'ils sont produits, entre autres, par les thrombocytes, sont caractérisés par un cycle de six atomes de carbone avec un éther intracyclique. Ils interviennent au niveau d'une lésion en réduisant le flux sanguin et en favorisant la formation d'un caillot. Ainsi, le thromboxane A_2, synthétisé dans les plaquettes, la rate, les poumons et le cerveau, est un contracturant des muscles lisses vasculaires et bronchiques et un puissant agrégant plaquettaire.

Les *leukotriènes (LT)*, trouvés pour la première fois dans les leucocytes, contiennent trois doubles liaisons conjuguées. Les leukotriènes A_4, B_4, C_4, D_4 et E_4 se forment à partir de l'acide 5-hydroperoxyéicosatétraénoïque (5-HPETE). Tous les leukotriènes sont des agents contracturants et stimulent la libération de prostaglandines et de thromboxanes par le poumon. Le leukotriène B_4 est un puissant facteur chimiotactique des polynucléaires et des monocytes. Les leukotriènes B_4, C_4 et D_4 augmentent la perméabilité cellulaire, produisent une hypertension suivie d'une hypotension, modifient la fréquence et le rythme cardiaques. Les leukotriènes C_4 et D_4 activent la synthèse des prostaglandines, produisent une vasoconstriction de la microcirculation pulmonaire et entraînent une constriction des bronches et de la trachée. Une hyperproduction de leukotriènes apparaît dans le choc anaphylactique et dans la crise d'asthme. La prednisone, médicament antiasthmatique, s'oppose à une telle hyperproduction.

Figure 17.9

O
COO⁻
CH3
Leukotriène A4
OH
OH
COO⁻
CH3
Leukotriène B4
Leukotriènes
Lipoxygénases
8
5
1
COO⁻
PLA2
DG lipase
Phospholipides
Diacylglycérols
CH3
11
14
Arachidonate
Endoperoxyde
Prostaglandine synthase
2 O2
O
O
COO⁻
OH
Prostaglandine H2(PGH2)
Thromboxane synthases
Autres prostaglandines PGA à PGF
Thromboxanes
O
COO⁻
CH3
OH
Prostaglandine A2
O
O
12
COO⁻
CH3
OH
Thromboxane A2(TXA2)

VITAMINES A

Le clivage du β-carotène conduit à deux molécules de vitamine A_1, ou rétinol, qui, oxydées, conduisent à un aldéhyde, le 11-*cis*-rétinal (*figure 17.10A*). Ce dernier se comporte alors en précurseur d'hormone ou de pigment visuel de l'œil chez les Vertébrés.

Le 11-*cis*-rétinal peut être oxydé en acide rétinoïque qui, après s'être lié à un récepteur nucléaire de la même famille que ceux des hormones stéroïdes ou du calcitriol, régule l'expression de certains gènes intervenant dans le développement du tissu épithélial et de la peau, en particulier. Pour cette raison, l'acide rétinoïque est utilisé dans le traitement de l'acné.

Le 11-*cis*-rétinal peut aussi s'unir à l'opsine en formant avec cette dernière une base de Schiff et être isomérisé par la lumière visible en all-*trans*-rétinal. Cette isomérisation est à l'origine d'un déplacement de l'atome d'azote de la base de Schiff et l'énergie lumineuse d'un photon est alors transformée en mouvement d'un atome, ce qui entraîne une suite d'événements conduisant à la fermeture de canaux ioniques et à la création d'un influx nerveux en direction du cerveau à l'origine du phénomène de la vision.

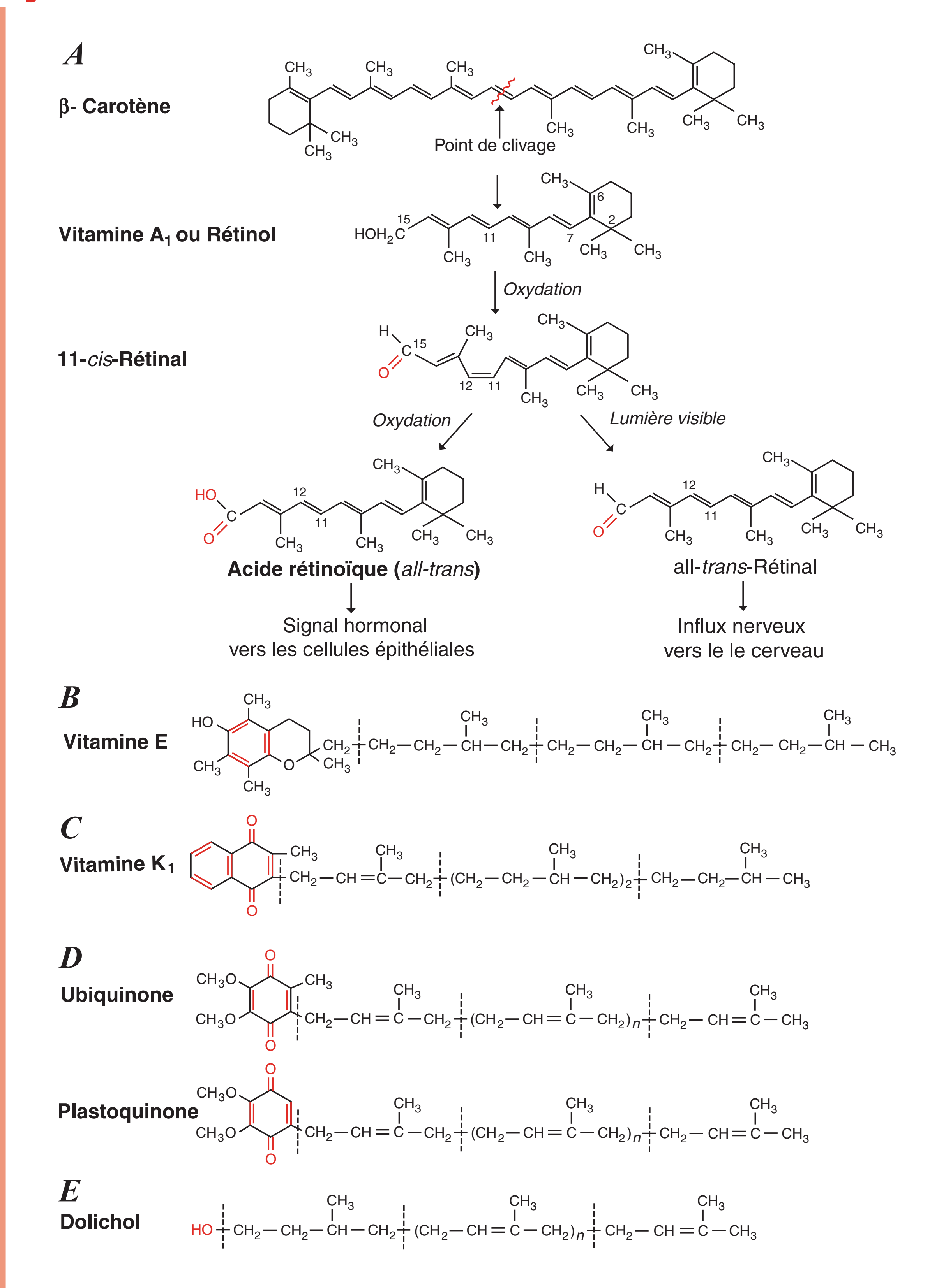
VITAMINES E, K ET QUINONES

La *vitamine E* est, en fait, un groupe de lipides appelés tocophérols et formés d'un cycle aromatique associé à une longue chaîne isoprénique (*Figure 17.10B*). Ce sont des antioxydants biologiques qui détruisent les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, de *reactive oxygen species*) et protègent les acides gras insaturés et les membranes contre des dommages provoqués par une oxydation.

La *vitamine K* (*Figure 17.10C*) intervient dans la coagulation sanguine et un déficit en vitamine K peut être à l'origine d'hémorragies fatales.

L'*ubiquinone*, ou coenzyme Q, et la *plastoquinone* (*Figure 17.10D*) sont des isoprénoïdes qui jouent le rôle de transporteurs lipophiles d'électrons dans les réactions d'oxydo-réduction dans les chaînes respiratoires (p. 244). Ces composés sont susceptibles d'accepter un ou deux électrons.

Les *dolichols* (*Figure 17.10E*) sont des isoprénoïdes très hydrophobes qui, d'une part peuvent s'insérer dans les membranes biologiques et qui, d'autre part, activent les glucides à fixer aux lipides pour former des glycolipides ou aux protéines pour donner des glycoprotéines.


Figure 17.10
A
β- Carotène
Point de clivage
Vitamine A1 ou Rétinol
Oxydation
11-cis-Rétinal
Oxydation
Lumière visible
Acide rétinoïque (all-trans)
all-trans-Rétinal
Signal hormonal
vers les cellules épithéliales
Influx nerveux
vers le le cerveau
B
Vitamine E
C
Vitamine K1
D
Ubiquinone
Plastoquinone
E
Dolichol

Chapitre 18

Réplication du DNA

La structure en double hélice du DNA permet, après séparation des deux brins, un copiage de ces derniers par appariement spécifique de bases selon Watson-Crick. Cependant, une telle réplication du matériel génétique nécessite un mécanisme extrêmement fidèle qui, comme tout processus de synthèse de macromolécules biologiques, évolue en trois phases : initiation, élongation et terminaison. Pour le réaliser au sein des cellules, des machines moléculaires complexes et très élaborées sont apparues tôt dans l'Évolution.

Tout d'abord, les deux brins du DNA qui ont une forte affinité l'un pour l'autre doivent être séparés, tout au moins dans une zone limitée pour donner accès aux bases qui servent de matrice. Des protéines spécialisées fondent la double hélice au niveau de sites spécifiques, puis des hélicases déplacent la région fondue le long de la double hélice et des topoisomérases libèrent la tension engendrée par le superenroulement.

Les DNA polymérases qui copient le DNA matriciel polymérisent les nucléotides dans la direction 5' → 3'. Un brin est synthétisé de façon continue tandis que le brin opposé l'est de façon discontinue, par fragments qui sont ensuite réunis.

La réplication devant être extrêmement fidèle pour assurer la pérennité de l'information génétique, des mécanismes assument la correction du DNA nouvellement formé ; dans les conditions physiologiques, il s'insère moins de 1 nucléotide incorrect sur 10^{10}. De plus, étant donné la taille des génomes et la vitesse de la division cellulaire, la réplication doit être très rapide ; ainsi, chez *E. Coli*, 2 000 bases sont incorporées en 1 seconde.

La machinerie de réplication ne peut pas reproduire les extrémités de DNA linéaire. Des structures spécialisées, les télomères, sont ajoutées aux extrémités des chromosomes.

LA RÉPLICATION DU DNA, MÉCANISME UNIVERSEL

Les êtres vivants sont capables de créer des copies d'eux-mêmes où le DNA doit être fidèlement dupliqué puisqu'il contient toute l'information génétique. La structure en double hélice du DNA suggère un mode de réplication par appariement spécifique de bases selon Watson-Crick à partir d'une matrice, cette dernière étant l'un des deux brins. Ce mécanisme s'est révélé exact. Grâce à une machinerie moléculaire complexe, il s'effectue selon un processus, essentiellement identique dans toutes les espèces, qui respecte des caractères fondamentaux concernant le mode de réplication, l'origine de la réplication sur le chromosome et la structure de la fourche de réplication.

Réplication semi-conservative

Afin de déterminer le mode de réplication du DNA, des expérimentations ont été effectuées par M. Meselson et F. Stahl avec des cellules de *E. Coli*. Ces dernières étaient cultivées pendant de nombreuses générations dans un milieu contenant du $^{15}NH_4Cl$; dans ces conditions, le DNA parental était entièrement marqué par l'isotope lourd ^{15}N. Puis, les bactéries étaient brusquement transférées dans un milieu ne contenant que l'isotope ordinaire ^{14}N. La distribution du ^{15}N et du ^{14}N après des cycles de reproduction était révélée par sédimentation à l'équilibre (*Figure 18.1A*). Après une génération, on observait une seule espèce de DNA dont la densité était à mi-chemin entre celle du ^{14}NDNA et celle du ^{15}NDNA ; il s'agissait donc de l'hybride ^{15}N-^{14}NDNA. Après deux générations, il apparaissait deux DNA en quantités égales ; l'un d'eux était l'hybride ^{15}N-^{14}NDNA, l'autre le ^{14}NDNA. L'azote d'une molécule de DNA était donc partagé également entre les deux molécules de DNA issues de la réplication suivant le modèle inspiré de l'appariement de bases selon Watson-Crick.

Origine de réplication et fourche de réplication

Des expérimentations ont été conduites par J. Cairns avec des cellules de *E. Coli* dont le DNA était rendu radioactif par incorporation de thymidine tritiée et visualisé par autoradiographie. Il est apparu que la réplication débutait toujours au niveau d'un point unique, dénommé origine, et qu'une région limitée, dénommée fourche de réplication en raison de sa forme en Y, se déplaçait sur la double hélice parentale, les deux brins séparés auxquels elle donnait naissance servant de matrice pour la synthèse du nouveau DNA (*Figure 18.1B*). Cette dernière s'effectuait toujours dans la direction 5' → 3', la matrice étant lue dans la direction opposée 3' → 5'.

Dans ces conditions, il se posait alors la question de savoir comment les deux nouveaux brins pouvaient être formés simultanément. La réponse a été apportée par Okazaki qui a montré qu'un des nouveaux brins était synthétisé sous la forme de fragments de quelques centaines de nucléotides, dénommés depuis fragments d'Okazaki. Ainsi, un brin dit avancé ou direct (*leading strand*) était synthétisé de façon continue dans la même direction que le déplacement de la fourche, tandis que l'autre brin, dit retardé (*lagging strand*), l'était de façon discontinue dans la direction opposée à celle du déplacement de la fourche. La fourche de réplication avait donc une structure asymétrique.

Figure 18.1

(A)

①

Molécule parentale d'origine

②

Première génération de molécules filles

(B)

DNA parental

5'
3'

3'
5' Brin avancé
(à synthèse continue)

3'
Sens du déplacement
de la fourche de réplication

5'
3'
Fragments d'Okazaki
5'
3' Brin retardé
5' (à synthèse discontinue)

LE DNA EST SYNTHÉTISÉ PAR DES DNA POLYMÉRASES

Dès 1955, une DNA polymérase, connue actuellement sous le nom de DNA polymérase I, a été isolée d'*E. coli* par A. Kornberg. Par la suite, au moins quatre autres polymérases ont été décrites, les polymérases II, III, IV et V. La polymérase III est l'enzyme essentiel pour la synthèse des chaînes polynucléotidiques chez *E. Coli*, tandis que la polymérase I joue un rôle dans la synthèse du brin retardé et que les polymérases II, IV et V interviennent dans la réparation du DNA. Toutes les polymérases ont en commun certaines caractéristiques fondamentales ; le mécanisme réactionnel est le même et une matrice (*template*) ainsi qu'une amorce (*primer*) de RNA sont nécessaires.

Le mécanisme réactionnel fondamental est le transfert d'un groupe phosphoryle (*Figure 18.2A*). Le nucléophile est le groupe hydroxyle en 3' du nucléotide de l'extrémité 3' du brin en formation ; ce groupe attaque le phosphore α du dNTP entrant et le pyrophosphate inorganique est libéré. Le mécanisme catalytique fait intervenir deux ions Mg^{2+} et trois résidus Asp. La réaction s'effectue sans variation importante d'énergie libre étant donné qu'une liaison phosphodiester est formée aux dépens d'une liaison anhydride d'acide ; en outre, l'hydrolyse du PP_i favorise la réaction. De plus, les interactions entre bases ainsi que l'empilement de ces dernières stabilisent le DNA

La polymérisation doit être dirigée par une matrice, en l'occurrence le brin de DNA à copier, selon les règles de l'appariement des bases de Watson-Crick (A = T, G = C). Les polymérases ajoutent donc des nucléotides au brin en cours de formation en se déplaçant le long de la matrice, puis elles s'en dissocient ; cependant, la processivité varie beaucoup selon le type de polymérase : certaines n'ajoutent que quelques nucléotides avant de se dissocier de la matrice, d'autres plusieurs milliers.

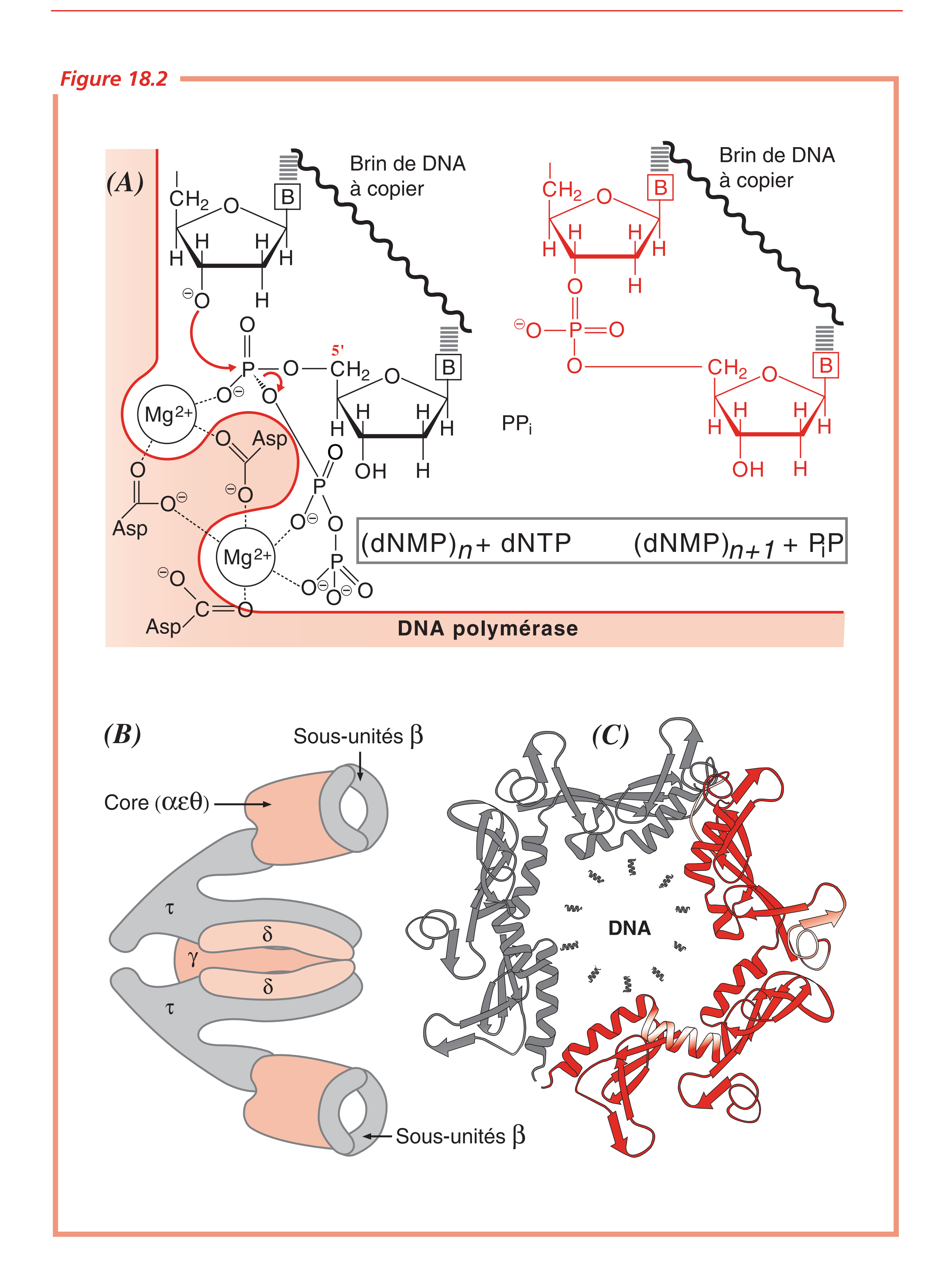
De plus, la polymérisation du DNA nécessite une amorce ; dans la plupart des cas, c'est un court segment de RNA complémentaire de la matrice présentant un groupe hydroxyle en 3' libre susceptible de réagir avec un désoxyribonucléotide ; l'amorce est synthétisée par un enzyme spécifique et elle est éliminée à la fin du processus de réplication.

Enfin, la polymérisation du DNA s'effectue avec une extrême fidélité, moins d'une erreur pour 10^{10} nucléotides ajoutés. Une telle précision ne peut être atteinte que grâce à une activité 3'$\rightarrow$5' exonucléase, dite de relecture et de correction de l'épreuve (*proofreading*), intrinsèque à pratiquement toutes les DNA polymérases et entièrement distincte de l'activité polymérase ; cette activité 3'$\rightarrow$5' exonucléase permet à l'enzyme d'éliminer tout nouveau nucléotide qui présenterait un mésappariement de bases

DNA polymérase III

La DNA polymérase III (*Figure 18.2B*) est l'enzyme responsable de la synthèse du DNA chez *E. Coli ;* d'une masse d'environ 800 kDa, elle est constituée de 10 types différents de sous-unités. Deux sous-unités θ s'associent chacune à une sous-unité α et à une sous-unité ε pour former deux cores $\alpha\varepsilon\theta$ qui possèdent l'activité polymérase due à la sous-unité α et l'activité exonucléase de relecture due à la sous-unité ε. Les deux cores sont liés l'un à l'autre par un complexe, dit complexe γ, constitué de cinq sous-unités de quatre types différents $\tau_2\gamma\delta\delta'$. Enfin, la polymérase est complétée par deux paires de sous-unités β qui forment un anneau à l'extrémité de chaque core (*Figure 18.2C*) ; ces anneaux entourent les brins de DNA et assurent la processivité en glissant le long de ces derniers.

Figure 18.2


(A)
Brin de DNA à copier
Brin de DNA à copier
5'
Mg2+
Asp
Asp
Asp
Mg2+
PPi
(dNMP)n+ dNTP (dNMP)n+1 + PiP
DNA polymérase
(B)
Sous-unités β
Core (αεθ)
τ
δ
γ
δ
τ
Sous-unités β
(C)
DNA

DNA polymérase I

La DNA polymérase I n'est pas l'enzyme responsable de la synthèse du DNA, mais elle effectue diverse tâches lors de la réplication, de la réparation ou des recombinaisons du DNA. C'est une chaîne polypeptidique unique de 103 kDa qui possède, outre une activité polymérase et une activité exonucléase de relecture 3'→5', une activité exonucléase 5'→3' localisée dans un domaine qui peut être séparé de l'enzyme par un traitement protéasique limité. Lorsque ce domaine est éliminé, il demeure un fragment de 68 kDa, dit fragment de Klenow, qui retient les activités polymérase et exonucléase de relecture.

RÉPLICATION DU DNA

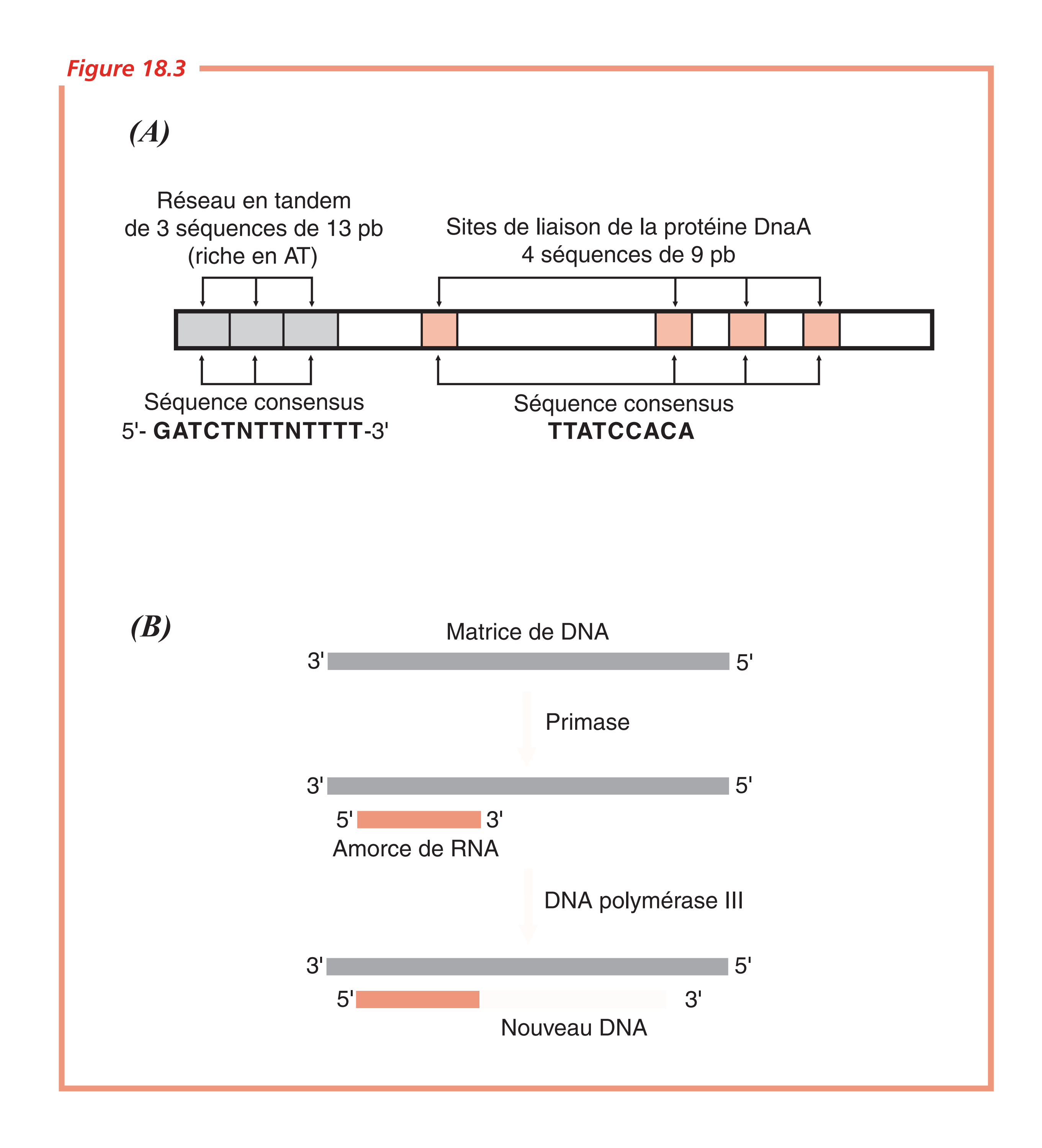
La réplication du DNA ne nécessite pas uniquement la polymérase III ; elle met en œuvre un complexe constitué d'une vingtaine de protéines, dénommé réplisome, qui effectue nombre de tâches différentes. Ce complexe associe, entre autres, des hélicases qui se déplacent le long du DNA et en séparent les deux brins, des topoisomérases qui évitent un stress topologique en éliminant les supertours, des protéines qui se fixent sur les brins de DNA séparés pour les maintenir écartés, des primases qui synthétisent les amorces de RNA et des ligases qui scellent les brins de DNA.

Schématiquement, la réplication du DNA se déroule en trois phases : initiation, élongation et terminaison.

La description ci-après s'appuie sur le mécanisme décrit pour *E. Coli*, mais en fait il est très conservé dans tous les systèmes de réplication.

Initiation

Chez *E. Coli*, l'origine de réplication est un site unique du DNA de 245 pb, dénommé *locus Ori C* (*Figure 18.3A*). Il contient des séquences consensus très conservées chez les Bactéries : quatre unités répétitives de 9 pb et un réseau de séquences de 13 pb en tandems riches en AT. Une dizaine de protéines et d'enzymes différents participent à la phase d'initiation de la réplication. L'événement initial fondamental est la fixation d'un complexe de plusieurs molécules d'une protéine dénommée protéine DnaA sur les quatre unités répétitives de 9 pb ; il initie une suite d'étapes intriquées conduisant au déroulement de la matrice de DNA et à la synthèse d'une amorce de RNA. Les protéines DnaA reconnaissent et dénaturent le DNA dans la région des unités répétitives de 13 pb ; ce processus nécessite de l'ATP. Puis, un hexamère d'une protéine dénommée protéine DnaB entoure, avec l'aide d'une protéine DnaC, chaque brin de DNA et se comporte alors en hélicase qui déroule le DNA et crée la fourche de réplication. Ensuite, des protéines SSB (de *single-stranded DNA-binding protein*) se fixent sur les brins séparés de DNA et empêchent toute renaturation ; de plus, une topoisomérase, la DNA-gyrase, élimine les supertours formés par le déroulement du DNA. Ce dernier est alors prêt et une amorce ribonucléotidique peut être synthétisée par une



RNA polymérase dénommée primase (*Figure 18.3B*). Les protéines qui interviennent dans cette étape d'initiation forment le complexe d'initiation, encore appelé primosome ou orisome.

L'initiation est la seule phase de la réplication qui soit régulée. Il est en effet essentiel qu'elle s'effectue au moment opportun et une seule fois au cours du cycle de division cellulaire. Cependant, son mécanisme est encore peu connu.

Élongation

La phase d'élongation de la réplication comporte deux opérations distinctes qui s'effectuent simultanément au niveau de la fourche de réplication et qui donc doivent être coordonnées : la synthèse du brin avancé et celle du brin retardé.

Les deux synthèses commencent après que les deux brins du DNA aient été séparés et qu'une amorce de RNA d'une dizaine de ribonucléotides ait été synthétisée par la primase (protéine DnaG). Puis, la DNA polymérase III ajoute les désoxynucléotides au fur et à mesure du déroulement du DNA par l'hélicase et de l'élimination des supertours par la DNA gyrase (*Figure 18.4A*).

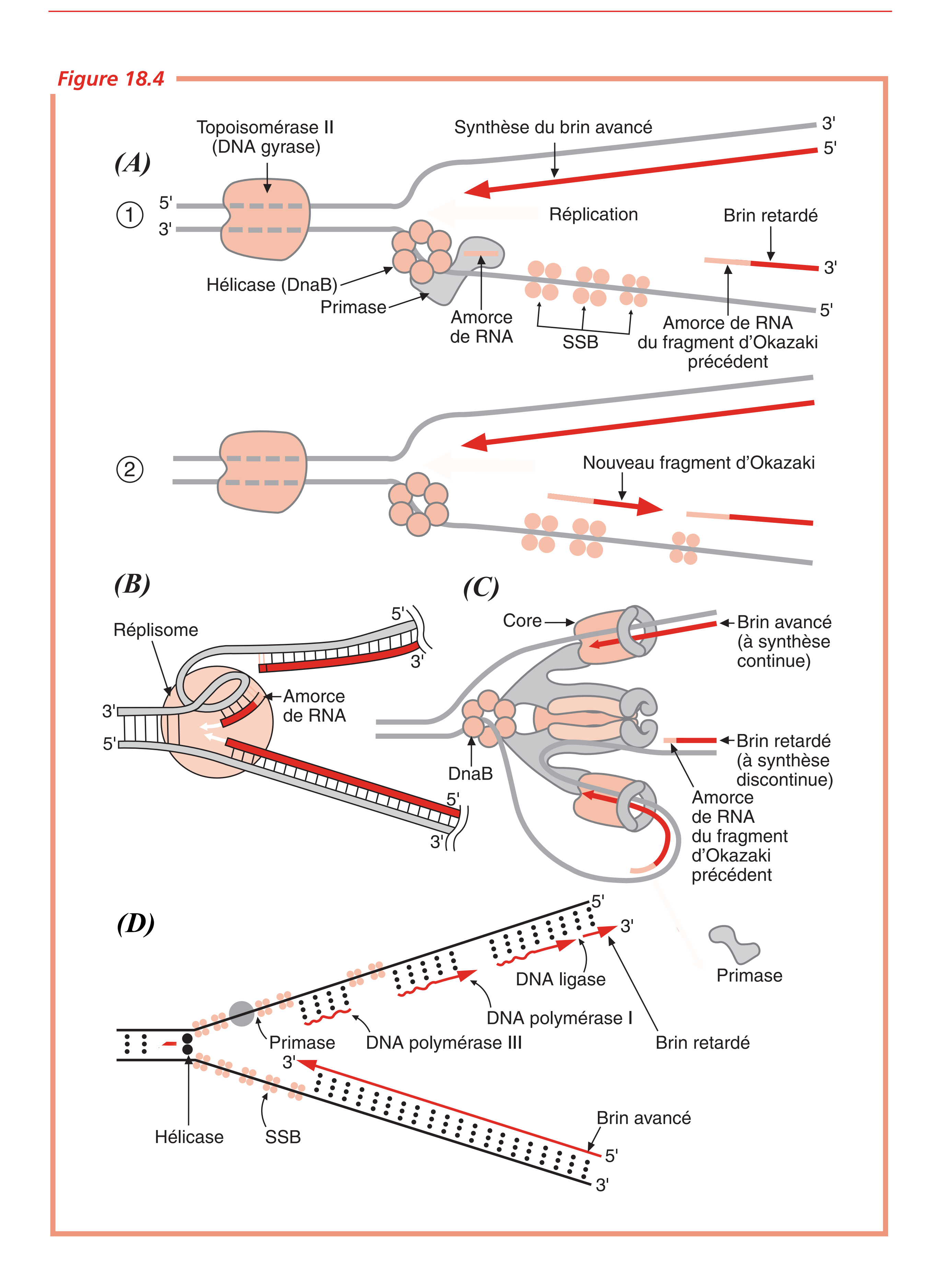
La synthèse du brin direct s'effectue de façon continue, la polymérase ne quittant pas la matrice avant que la réplication ne soit terminée. Celle du brin retardé, qui s'effectue par fragments (les fragments d'Okazaki) est plus complexe. La formation d'une boucle dans la matrice du brin retardé (*Figure 18.4B*) met ce dernier en position pour une polymérisation 5' → 3'. La matrice du brin retardé en forme de boucle passe alors à travers le site polymérase d'une sous-unité de la polymérase III dimérique dans le même sens que la matrice du brin avancé dans l'autre sous-unité (*Figures 18.4C*). La DNA polymérase III quitte la matrice du brin retardé après avoir ajouté 1 000 nucléotides environ. Une nouvelle boucle est alors formée et la primase synthétise une nouvelle amorce. Puis les discontinuités entre les fragments d'Okazaki sont comblées par la DNA polymérase I et enfin la DNA ligase réunit les fragments (*Figures 18.4D*).

Terminaison

Chez *E. Coli*, la fourche de réplication du DNA circulaire atteint une région contenant de nombreuses copies d'une séquence de 20 pb dénommée séquence Ter où elle est captée et la réplication s'arrête.

TÉLOMÈRES

Les chromosomes des Eucaryotes sont linéaires et non pas circulaires, comme ceux des Bactéries. Les extrémités libres des molécules linéaires de DNA ne peuvent pas être répliquées complètement et chaque cycle pourrait raccourcir le chromosome. En fait, les extrémités des chromosomes, appelées télomères, contiennent des centaines de séquences répétitives hexanucléotidiques en tandem. Les télomères forment de larges boucles en double brin stabilisées par des protéines spécifiques qui protégeraient et masqueraient les extrémités des chromosomes. Les télomères sont répliqués par une télomérase, qui est une transcriptase inverse spécialisée qui porte sa propre matrice de RNA.


Figure 18.4
(A)
Topoisomérase II
(DNA gyrase)
Synthèse du brin avancé
3'
5'
①
5'
3'
Réplication
Brin retardé
3'
Hélicase (DnaB)
Primase
Amorce
de RNA
SSB
5'
Amorce de RNA
du fragment d'Okazaki
précédent
②
Nouveau fragment d'Okazaki
(B)
Réplisome
5'
3'
3'
5'
Amorce
de RNA
5'
3'
(C)
Core
Brin avancé
(à synthèse
continue)
DnaB
Brin retardé
(à synthèse
discontinue)
Amorce
de RNA
du fragment
d'Okazaki
précédent
(D)
5'
3'
DNA ligase
Primase
DNA polymérase I
Primase
DNA polymérase III
Brin retardé
3'
Brin avancé
5'
3'
Hélicase
SSB

Chapitre 19

Biosynthèse du RNA

Le RNA est la seule macromolécule biologique à posséder à la fois la capacité de contenir une information génétique et celle de catalyser des réactions biochimiques. En effet, chez la plupart des êtres vivants, le DNA stocke l'information génétique mais l'expression de cette dernière nécessite qu'elle soit transférée au RNA qui seul peut la faire passer dans la structure des protéines lors des réactions de polymérisation des aminoacides dont il assure tout à la fois l'ordre d'enchaînement grâce aux RNA messagers et aux RNA de transfert ainsi que l'essentiel de la catalyse grâce au RNA ribosomique 23S. Un autre aspect du pouvoir catalytique du RNA est la possibilité qu'ont certains RNA de s'épisser eux-mêmes.

La grande souplesse de structure du RNA permet à ce dernier d'assumer une telle diversité de fonctions. En effet, contrairement au DNA qui apparaît sous la forme d'une double hélice compacte que seuls des enzymes très spécifiques peuvent dérouler, le RNA adopte une forme en simple brin susceptible d'adopter une grande diversité de structure en se reployant sur lui-même. Néanmoins, comme pour le DNA, dans les organismes actuels, le RNA doit être associé à certaines protéines pour qu'il puisse exercer ses fonctions ; il est donc un constituant des ensembles macromoléculaires complexes qui effectuent la biosynthèse des protéines.

Toutes les molécules de RNA, à l'exception du RNA génomique de certains virus, sont synthétisées selon une information génétique stockée dans le DNA grâce à des systèmes enzymatiques complexes, les RNA polymérases DNA-dépendantes. Lors de ce processus de transcription, l'information génétique portée par un segment de DNA double brin est convertie en une information contenue dans un segment de RNA simple brin dont la séquence des bases est complémentaire de celle de l'un des brins du DNA. Trois types de RNA sont ainsi produits : les RNA messagers, qui codent pour la séquence des aminoacides des protéines, les RNA de transfert qui lisent l'information contenue dans un RNA messager et apportent l'aminoacide approprié à la chaîne polypeptidique en cours d'élaboration et enfin les RNA ribosomiques, constituants essentiels des ribosomes, machines moléculaires spécialisées dans la biosynthèse des protéines.

Ce chapitre expose tout d'abord la synthèse du RNA à partir d'une matrice de DNA chez les Procaryotes et chez les Eucaryotes puis les importants processus post-synthétiques de maturation du RNA.

LA TRANSCRIPTION EST EFFECTUÉE PAR DES RNA POLYMÉRASES DNA-DÉPENDANTES

La biosynthèse du RNA, ou transcription, est le processus qui transcrit l'information génétique contenue dans une séquence du DNA en une information portée par une séquence de RNA. Elle rappelle la biosynthèse du DNA, ou réplication ; en effet, elle est dirigée par une matrice, elle respecte une polarité, son mécanisme réactionnel est semblable à celui de réplication du DNA et elle s'effectue en trois phases : initiation, élongation, terminaison. En revanche, elle diffère de la réplication du DNA par deux points ; elle ne nécessite pas d'amorce et ne concerne que des segments limités du DNA. La transcription est assurée par des RNA polymérases DNA-dépendantes. Ces enzymes sont de volumineux ensembles protéiques qui, en dépit de différences dans la taille et le nombre des sous-unités chez les Procaryotes et les Eucaryotes, ont tous une structure d'ensemble très semblable et sont susceptibles d'assumer l'essentiel des fonctions nécessaires à l'évolution d'un processus biosynthétique complexe.

LA TRANSCRIPTION CHEZ LES PROCARYOTES

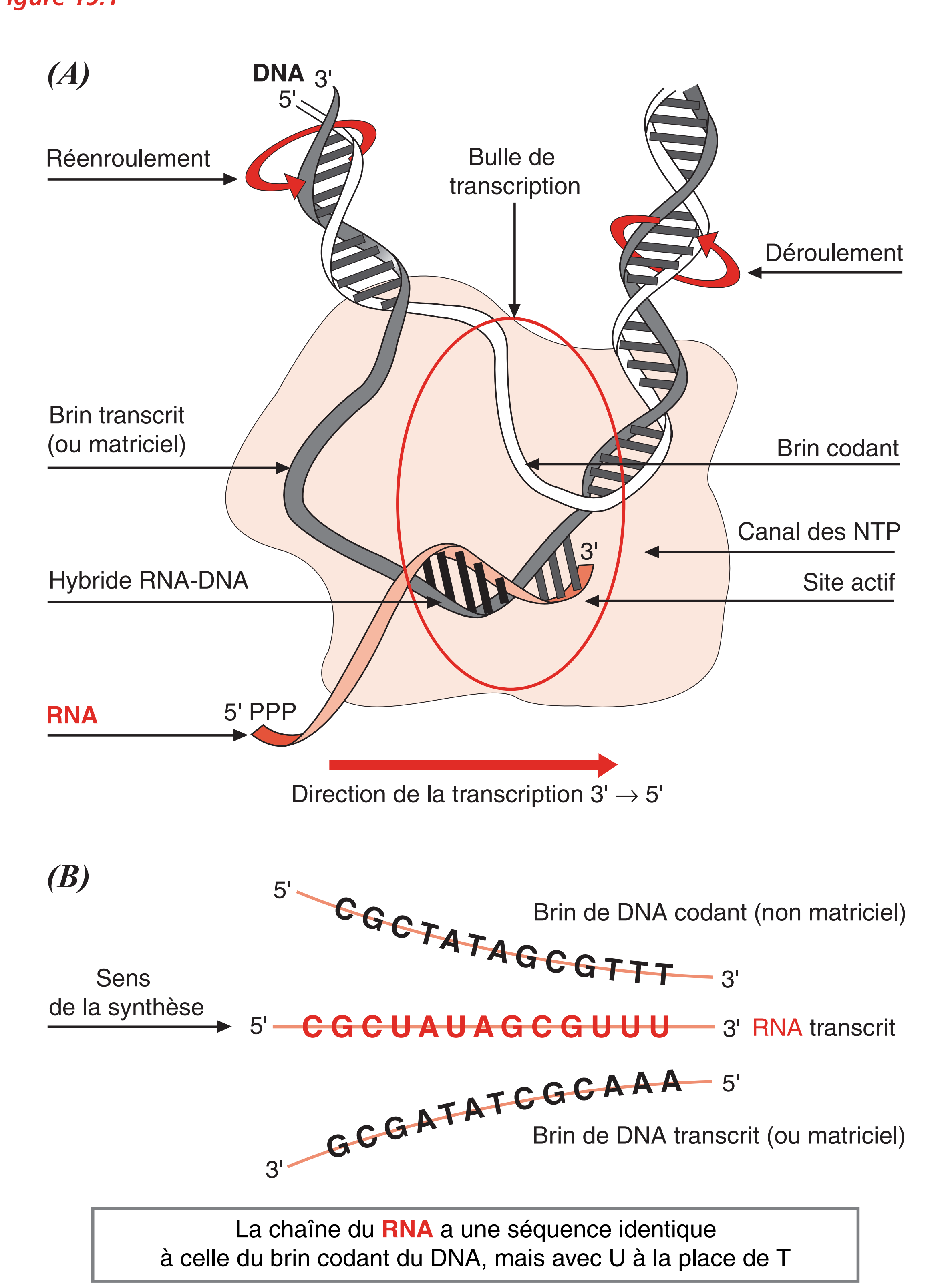
La RNA polymérase des Procaryotes assure l'élongation

Les Procaryotes ne possèdent qu'une seule RNA polymérase DNA-dépendante. Celle d'*E. Coli* est un complexe de 400 kDa environ, $\alpha_2\beta\beta'\sigma$, constitué donc de quatre types de sous-unités. La sous-unité σ contribue à la découverte d'un site promoteur où commence la transcription, participe à l'initiation de la synthèse du RNA, puis se dissocie du reste de l'enzyme, le core $\alpha_2\beta\beta'$. Ce dernier contient le site catalytique où se situe une bulle de DNA fondu, dite bulle de transcription (*Figure 19.1A*).

La réaction catalysée par la RNA polymérase requiert la présence des quatre ribonucléosides 5'-triphosphate (NTP) précurseurs des unités nucléotidiques du RNA, l'ATP, le GTP, l'UTP et le CTP, qui se fixent sur la chaîne β. Elle nécessite aussi une matrice de DNA double brin qui entre en contact avec la chaîne β'. Enfin, les ions Mg^{2+} et Zn^{2+} sont indispensables.

La RNA polymérase assure l'élongation de la chaîne polynucléotidique en se déplaçant de la gauche vers la droite sur le DNA (*Figure 19.1A*) à une vitesse de 50 à 90 nucléotides/s, ce qui permet le déroulement transitoire d'environ 17 pb du DNA et l'élongation du brin de RNA par l'addition successive d'unités nucléotidiques à son extrémité 3'-hydroxyle dans le sens 5' → 3' ; la RNA polymérase est donc un enzyme processif. Un seul brin de la matrice de DNA, dit brin transcrit ou matriciel ou encore anti-sens (–), est copié dans le sens 3' → 5', la sélection des nucléotides étant assurée par un appariement de bases de type Watson-Crick, avec l'insertion de résidus uracile U dans le RNA en regard des résidus adénine A de la matrice de DNA (*Figure 19.1B*). Le RNA transcrit a donc une séquence identique à celle du brin non transcrit de la matrice, dit brin codant ou non matriciel ou encore sens (+), mais avec des résidus U dans le RNA à la place des résidus T dans le DNA. Pour un gène particulier, le brin codant peut être situé sur l'un ou l'autre des deux brins d'un chromosome donné. Par convention, les séquences régulatrices qui contrôlent la transcription appartiennent au brin codant.

Figure 19.1


(A)
DNA 3'
5'
Réenroulement
Bulle de transcription
Déroulement
Brin transcrit (ou matriciel)
Brin codant
Canal des NTP
3'
Hybride RNA-DNA
Site actif
RNA
5' PPP
Direction de la transcription 3' → 5'
(B)
5'
C G C T A T A G C G T T T
Brin de DNA codant (non matriciel)
3'
Sens de la synthèse
5' C G C U A U A G C G U U U 3' RNA transcrit
G C G A T A T C G C A A A
5'
Brin de DNA transcrit (ou matriciel)
3'
La chaîne du RNA a une séquence identique à celle du brin codant du DNA, mais avec U à la place de T

Le mécanisme de la réaction (*Figure 19.2A*) consiste en l'attaque du groupe hydroxyle 3'-OH nucléophile sur le phosphore α du NTP entrant ; il rappelle donc celui mis en œuvre par les DNA polymérases (p. 344). Trois résidus aspartate conservés de l'enzyme participent à la liaison des ions métalliques.

La RNA polymérase ne nécessite pas d'amorce. De plus, elle ne possède pas de site actif 3' → 5' exonucléasique séparé permettant une activité correctrice (*proofreading*).

La synthèse du RNA est initiée au niveau de promoteurs

Pour être active, toute RNA polymérase doit se fixer au niveau de séquences spécifiques du DNA, appelées promoteurs, qui dirigent la transcription des gènes adjacents. Les sites promoteurs peuvent être identifiés et caractérisés par un ensemble de techniques parmi lesquelles celle du *footprinting* (empreinte de pas) tient une place importante. Chez *E. Coli*, la fixation de la RNA polymérase s'effectue dans une région s'étendant de 70 pb environ avant le site de début de la transcription (– 70) à 30 pb environ après ce site (+ 30) ; la région promotrice doit donc se situer entre – 70 et + 30.

La comparaison des séquences de nombreux promoteurs bactériens a révélé la présence de deux courts motifs communs, ou séquences consensus, susceptibles d'entrer en interaction avec la sous-unité σ : la séquence – 10, (5')TATAAT(3'), et la séquence – 35, (5')TTGACA(3'), (*Figure 19.2B*). Un troisième élément de reconnaissance riche en AT, dénommé élément UP (*upstream promoter*) apparaît fréquemment entre – 40 et – 60 dans les promoteurs de certains gènes très exprimés. L'importance fonctionnelle des promoteurs diffère considérablement selon leur capacité à se lier plus ou moins fortement à la sous-unité σ. Des gènes pourvus de promoteurs forts sont transcrits fréquemment ; en revanche, ceux qui possèdent des promoteurs faibles sont peu transcrits.

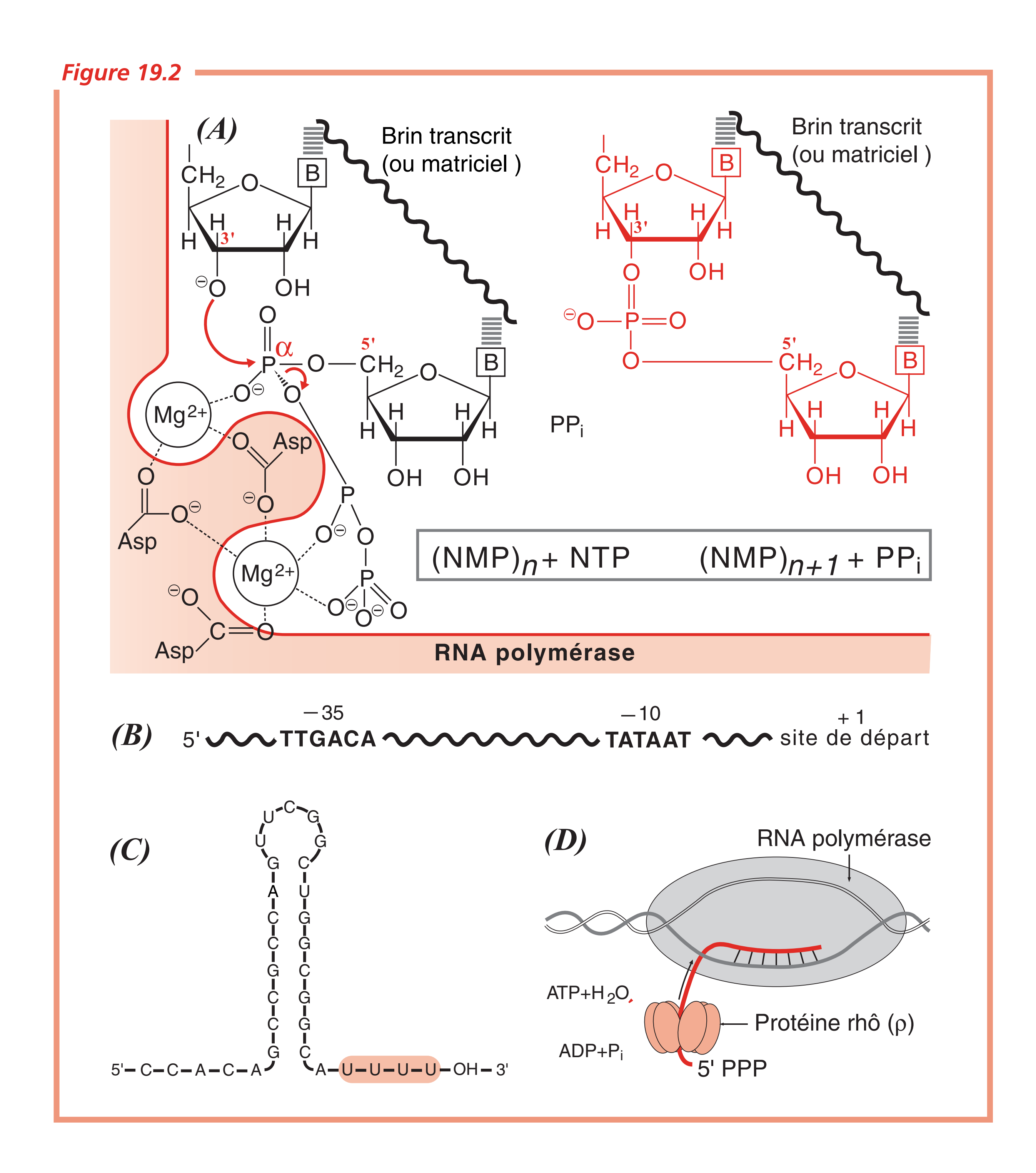
L'initiation de la transcription est un mécanisme qui se déroule en deux étapes : fixation, puis initiation proprement dite. Il y a tout d'abord fixation de la polymérase sur le promoteur avec la formation d'un complexe fermé où le DNA est intact, puis d'un complexe ouvert où le RNA est partiellement déroulé. L'initiation de la transcription peut alors commencer et, après élimination de la sous-unité σ, le déplacement de la polymérase permet l'élongation du RNA.

La synthèse du RNA se termine au niveau de structures d'arrêt ou grâce à l'intervention de protéines spécifiques

Tout comme l'initiation, la terminaison de la transcription est contrôlée de façon précise. La formation des liaisons phosphodiester cesse, l'hybride RNA-DNA se dissocie, la région fondue du DNA se réenroule et la RNA polymérase quitte le DNA lorsque des régions du DNA en cours de transcription présentent des signaux d'arrêt.

Le signal d'arrêt le plus simple est une région palindromique riche en GC suivie d'une région riche en AT ; le RNA transcrit de ce DNA palindromique est autocomplémentaire et ses bases s'apparient pour constituer une structure en épingle à cheveux, elle-même suivie d'une séquence de quatre résidus uracile U essentiels pour la terminaison (*Figure 19.2C*).

Figure 19.2



De plus, le RNA naissant peut présenter des séquences riches en cytosine et pauvres en guanine qui fixent spécifiquement une protéine hexamérique, dite protéine rhô (ρ) (*Figure 19.2D*). Cette dernière possède une activité ATPase RNA-dépendante et se déplace sur le RNA dans le sens 5' → 3' (*Figure 19.2D*). Lorsqu'elle atteint la RNA polymérase au niveau de la bulle de transcription, elle rompt l'hélice hybride RNA-DNA. D'autres protéines bactériennes, telles que la protéine nusA, modulent la terminaison de la transcription de certains gènes.

LA TRANSCRIPTION CHEZ LES EUCARYOTES

Le RNA des Eucaryotes est synthétisé par trois types de RNA polymérases, Pol I, Pol II et Pol III, localisées dans des régions différentes du noyau (*Tableau 19.1*). Toutes sont de grosses protéines, d'une masse supérieure à 500 kDa, constituées de 8 à 14 sous-unités. Elles sont analogues les unes aux autres et à la RNA polymérase des Procaryotes. La plus grosse sous-unité (220 kDa) de Pol II possède un domaine C-terminal où apparaissent de nombreuses unités répétitives de la séquence consensus –YSPTSPS– ; ce domaine joue un rôle important dans les fonctions de Pol II.

Les gènes des Eucaryotes, comme ceux des Procaryotes, présentent des promoteurs, encore appelés éléments *cis*, qui permettent l'initiation de la transcription ; les trois types de polymérases eucaryotes transcrivent à partir de promoteurs spécifiques. De plus, les gènes des eucaryotes contiennent d'autres éléments *cis*, dénommés aussi séquences activatrices (*enhancers*), qui sont susceptibles d'augmenter considérablement l'efficacité des promoteurs ; ces séquences activatrices jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes en fonction des tissus et/ou des stades du développement. Les séquences des éléments *cis* du DNA sont des sites de liaison pour des protéines appelées facteurs de transcription, ou encore facteurs *trans*. Leur liaison à une séquence reconnue du DNA permet à la RNA polymérase de localiser le site d'initiation correct. L'étude de Pol II permet d'illustrer les notions qui viennent d'être exposées.

La RNA polymérase II

Les promoteurs de Pol II sont localisés sur le côté 5' du site d'initiation de la transcription. Le plus important est la TATA box, ainsi dénommée en raison de sa séquence consensus située entre les positions – 30 et – 100. De plus, de nombreux promoteurs contiennent une CAAT box et parfois une GC box, localisées entre – 40 et – 150. Contrairement aux séquences – 10 et – 35 des promoteurs procaryotes qui fixent directement la RNA polymérase et son facteur de liaison σ, la TATA box, la CAAT box, la GC box, ainsi que les autres facteurs *cis* éventuels, sont tout d'abord reconnus par des protéines autres que Pol II, les facteurs de transcription qui initient l'assemblage d'un complexe de transcription actif.

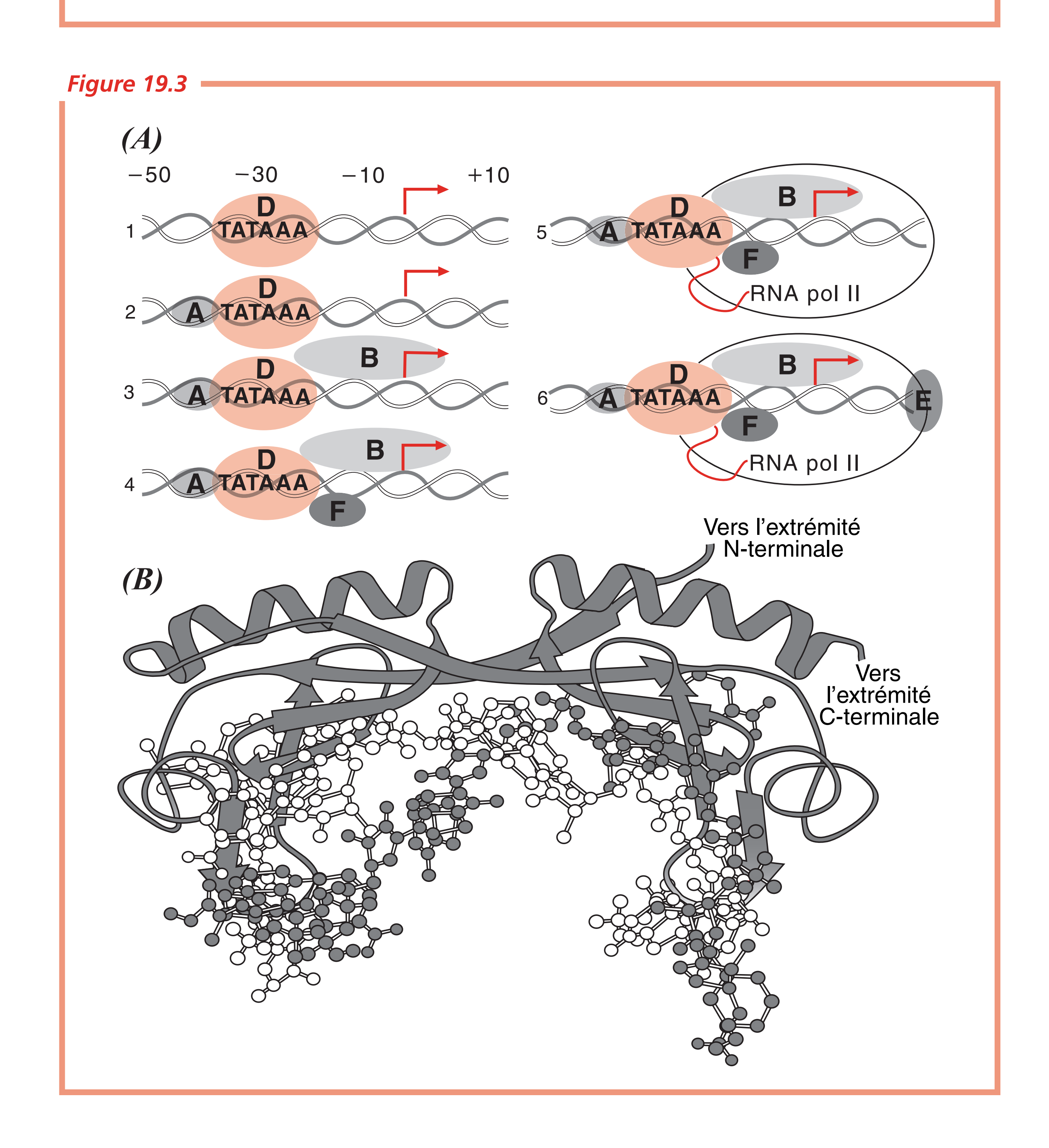
Les facteurs de transcription de Pol II, connus sous le nom collectif de TFII, sont individuellement dénommés TFIIA, TFIIB, et ainsi de suite (*Figure 19.3A*). L'événement primordial est la fixation de TFIID, gros complexe protéique de 700 kDa environ dont un constituant de 30 kDa, la TBP (de *TATA box-binding protein*), se lie très étroitement à la TATA box. La TBP, constituée de deux domaines semblables, a une forme de selle qui lui permet de se fixer sur le segment de DNA reconnu et d'y induire d'importants changements conformationnels qui permettent de déterminer un site d'initiation spécifique et d'assurer que la transcription s'effectuera de façon unidimensionnelle. La surface de la TBP apporte de plus des sites d'arrimage pour d'autres facteurs de transcription qui, avec Pol II dont le domaine C-terminal est phosphorylé, constituent alors le complexe de transcription basal.

En outre, la fixation de nombreux facteurs de transcription, tels que Sp1, NF1, HSTF, ainsi que la stimulation d'autres séquences activatrices sont nécessaires pour une expression efficace et sélective de gènes spécifiques

Tableau 19.1

	Type	Localisation	Transcrits cellulaires
RNA polymérases eucaryotes	Pol. I	Nucléole	rRNA 18S, 5,8S et 28S
	Pol. II	Nucléoplasme	Précurseurs des mRNA et snRNA
	Pol. III	Nucléoplasme	tRNA et rRNA 5S

Figure 19.3



LA MATURATION DU RNA

La plupart des molécules de RNA des Bactéries et pratiquement toutes les molécules de RNA des Eucaryotes synthétisées d'après un brin matriciel de DNA, ou transcrits primaires, sont l'objet d'une maturation. En particulier, nombre de gènes contiennent des séquences qui sont transcrites par les RNA polymérases puis éliminées par un processus d'excision-épissage. De plus, des modifications peuvent être apportées aux extrémités 5' ou 3'. Les réactions qui assurent la maturation du RNA ne sont pas catalysées uniquement par des protéines enzymatiques ; le RNA lui-même peut intervenir dans le processus. Ce sont les mRNA des Eucaryotes ainsi que les tRNA des bactéries et des Eucaryotes qui subissent la maturation la plus importante.

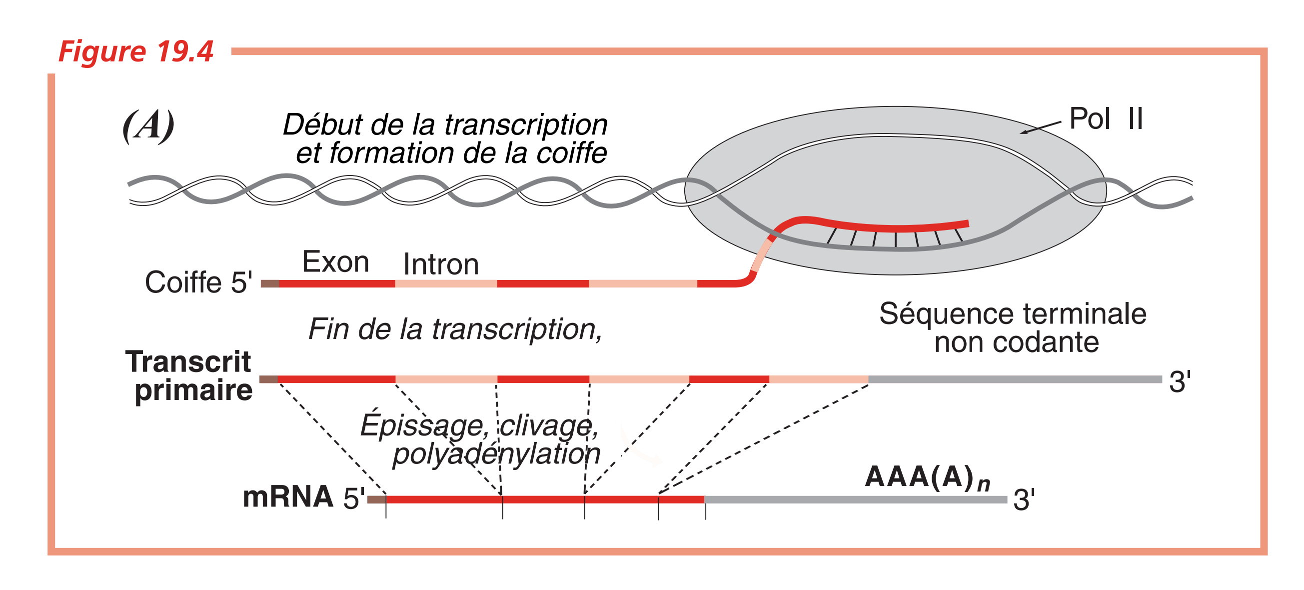
MATURATION DES mRNA DES EUCARYOTES

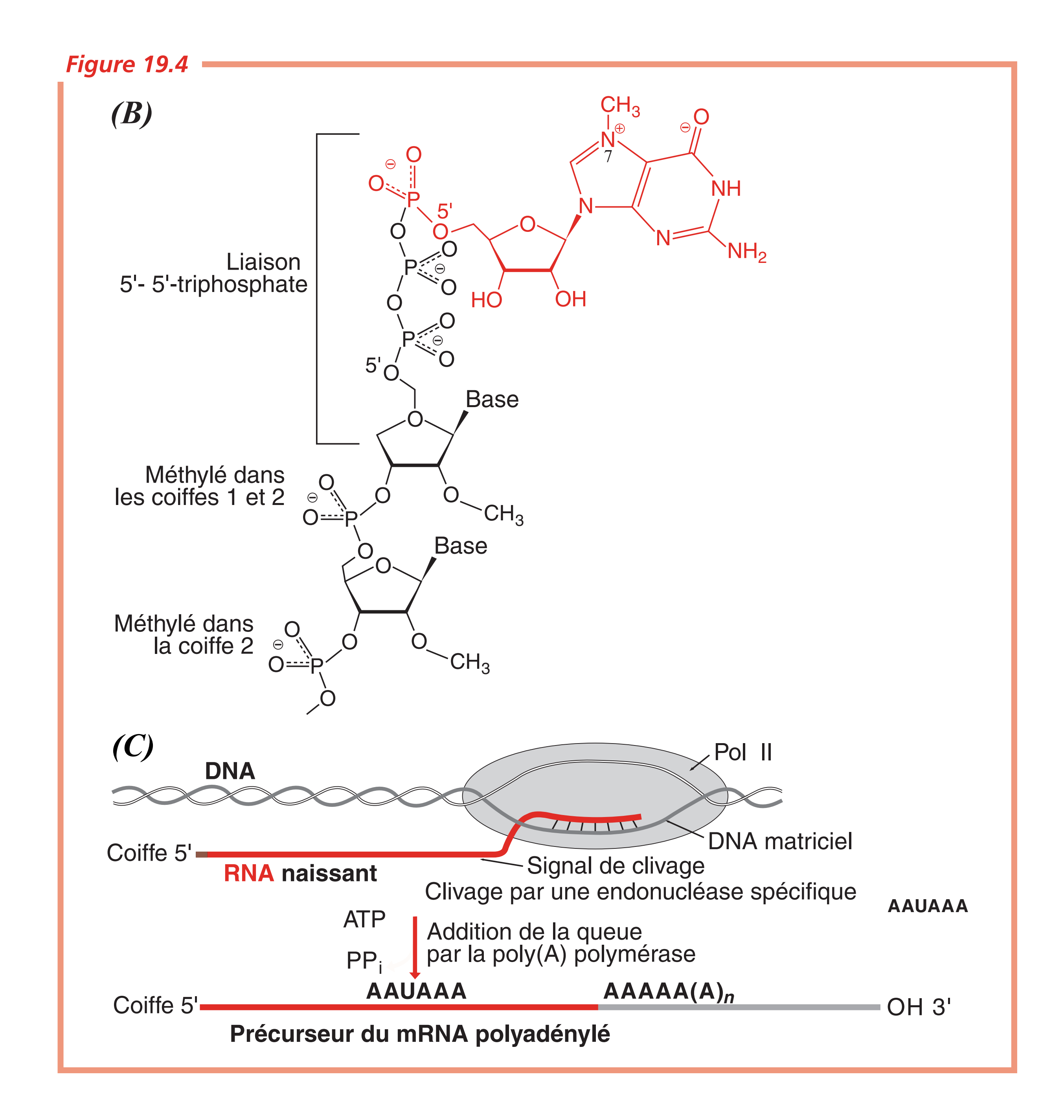
La maturation de la plupart des pré-mRNA des Eucaryotes comporte plusieurs étapes : formation de la coiffe, élimination des introns, clivage et polyadénylation ; l'élimination des introns, peut avoir lieu avant ou après le clivage et la polyadénylation. Toutes les étapes s'effectuent au sein du noyau (*Figure 19.4A*).

Formation de la coiffe

Bien avant d'être terminé, le transcrit primaire constitué alors de 20 à 30 nucléotides est modifié à son extrémité 5' qui acquiert une coiffe (*cap*) (*Figure 19.4B*). Après hydrolyse de l'un des trois phosphates fixés à son extrémité 5', le mRNA naissant attaque le phosphate α d'une molécule de GTP pour former la liaison inhabituelle 5'-5' triphosphate. La S-adénosyl-méthionine méthyle alors l'azote N-7 de la guanine pour former la coiffe 0 et, éventuellement, les riboses adjacents, ce qui conduit aux coiffes 1 ou 2. Les enzymes qui catalysent ces réactions et le transcrit lui-même sont étroitement associés au domaine C-terminal de Pol II par l'intermédiaire d'un complexe dénommé CBP (*de cap-binding complex*). Les coiffes protègent les mRNA des phosphatases et des endonucléases et stimulent leur traduction.

Figure 19.4





Clivage et polyadénylation

Le transcrit primaire est tout d'abord clivé par une endonucléase spécifique qui est l'un des constituants d'un gros complexe enzymatique associé à l'extrémité C-terminale de Pol II. L'endonucléase reconnaît la séquence très conservée (5')AAUAAA(3') et clive le transcrit à un niveau où une poly(A) polymérase ajoute 80 à 250 résidus adénylate à l'extrémité 3', au cours d'une réaction où l'ATP est le donneur (*Figure 19.4C*). La queue poly(A) et les protéines susceptibles de s'y associer protègent les mRNA d'une destruction enzymatique rapide.

$$\text{RNA} + n\text{ATP} \longrightarrow \text{RNA} - (\text{AMP})n + n\text{PP}_i$$

Élimination des introns

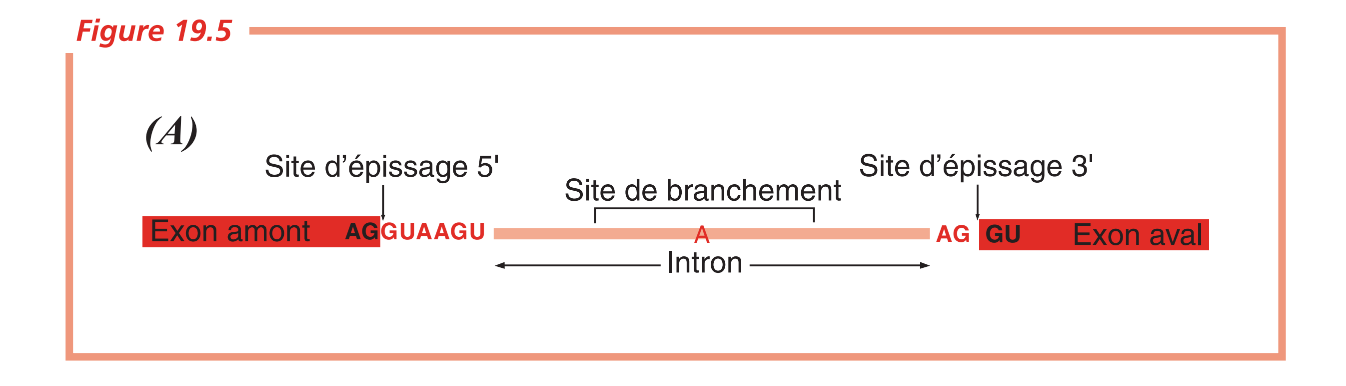
Lorsqu'ils sont synthétisés, les transcrits primaires nucléaires sont constitués de régions codantes, ou exons, et de régions non codantes, ou introns. Ces derniers sont éliminés et les exons réunis pour former une séquence continue définissant un polypeptide fonctionnel au cours d'un processus excision-épissage (*splicing*) réalisé grâce à deux réactions de trans-estérification dont le déroulement et la catalyse sont en fait extrêmement complexes. Les sites d'épissage des précurseurs des mRNA sont très précisément définis et l'épissage lui-même s'effectue au sein de spliceosomes.

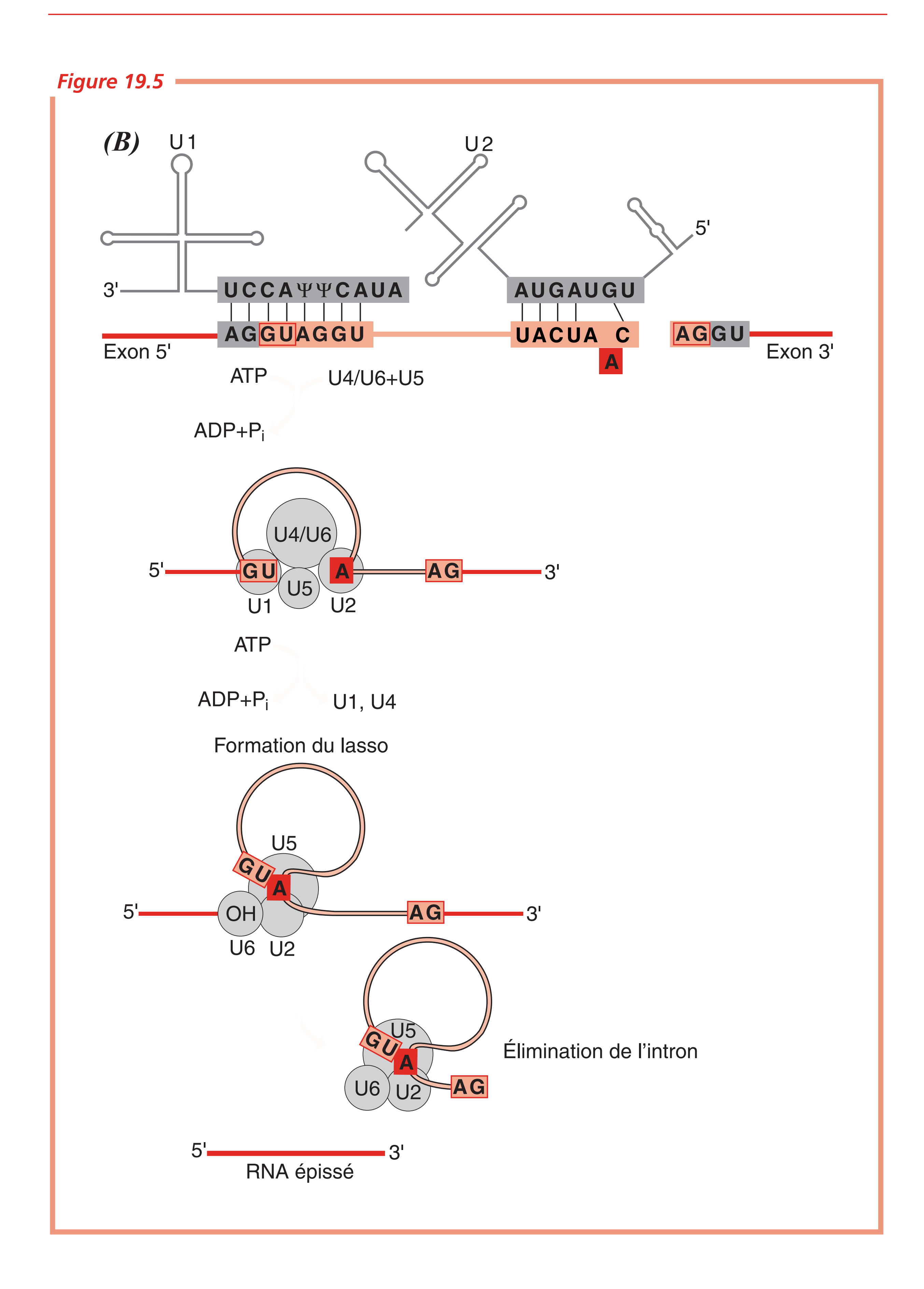
Les sites d'épissage sont marqués par des séquences situées aux extrémités des introns. Chez tous les Eucaryotes, la séquence des bases d'un intron commence par GU et se termine par (Py)*n*NCAG où (Py) est un segment d'une dizaine de bases pyrimidiques suivi d'une base quelconque (*Figure 19.5A*). Chez les Vertébrés, le site d'épissage 5' se situe entre AG et GUAAGU, le site d'épissage 3' entre CAG et GU Les introns ont aussi un site interne, appelé site de branchement, qui intervient dans la formation du lasso (*voir ci-après*).

Les spliceosomes sont de très gros ensembles dynamiques de 60S environ, constitués, outre du précurseur du mRNA à traiter, de snRNP (souvent prononcées « snurps ») et d'autres protéines appelées facteurs d'épissage. Les snRNP (de s*mall* n*uclear* r*ibo*n*ucleo-protein particules*) sont des complexes qui associent à des protéines spécifiques des RNA de moins de 300 nucléotides, les snRNA (de s*mall* n*uclear* RNA) dont certains d'entre eux, appelés U1, U2, U4, U5 et U6, sont essentiels pour l'épissage.

L'excision-épissage est réalisé grâce à deux réactions successives de transestérification (*Figure 19.5B*). L'U1-snRNA, qui contient une séquence complémentaire du site d'épissage 5' de l'intron, s'apparie à ce dernier. L'U2-snRNA s'apparie au site de branchement de telle façon qu'un résidu A nucléophile soit mis en position d'attaquer par son hydroxyle en 2' le phosphate du résidu G situé à l'extrémité 5' de l'intron et donc de réaliser une première transestérification qui conduit à la formation d'un lasso (*lariat*) par l'intermédiaire d'une liaison 2',5'-phosphodiester. Lors d'une deuxième réaction de transestérification, l'hydroxyle en 3' de l'exon libre attaque la liaison phosphodiester de la deuxième jonction intron-exon, ce qui réalise la jonction entre les deux exons et libère l'intron porteur du lasso. Des anomalies dans l'excision des introns peuvent être à l'origine de maladies génétiques telles que certaines thalassémies où sont synthétisées des hémoglobines anormales.

Figure 19.5




Figure 19.5
(B)
U1
U2
5'
3'
UCCAΨΨCAUA
AUGAUGU
AGGUAGGU
UACUA C
A
AGGU
Exon 5'
Exon 3'
ATP
U4/U6+U5
ADP+Pi
U4/U6
5'
GU
A
AG
3'
U5
U1
U2
ATP
ADP+Pi
U1, U4
Formation du lasso
U5
GU
A
5'
OH
AG
3'
U6 U2
U5
GU
A
Élimination de l'intron
U6
U2
AG
5'
3'
RNA épissé

Chez les Eucaryotes, les transcrits primaires de certains mRNA ne donnent qu'un mRNA mature, et donc qu'une seule chaîne polypeptidique. Cependant, d'autres transcrits primaires peuvent être épissés de plusieurs façons (*Figure 19.5C ou 6A*). Cet épissage alternatif augmente considérablement la versatilité des séquences génomiques et conduit à des formes distinctes d'une protéine dans les divers tissus ou à des étapes spécifiques du développement. Chez l'Homme, environ 30 % des gènes sont l'objet d'un épissage alternatif.

Editing des mRNA

L'excision-épissage n'est pas le seul processus susceptible de modifier les pré-mRNA. La séquence de certains pré-mRNA est modifiée après la transcription par une correction éditoriale (*editing*). C'est en particulier le cas de l'apolipoprotéine B (apo B) qui se présente sous la forme apo B-100, de 512 kDa, synthétisée dans le foie et apo B-48, de 240 kDa, synthétisée dans l'intestin. Dans l'intestin, mais pas dans le foie, le mRNA voit après sa synthèse l'un de ses résidus cytidine désaminé en uridine par une désaminase spécifique, ce qui change le codon du résidu 2153 de CAA (Gln) en codon stop UAA.

D'autres protéines, telles que le récepteur du glutamate, sont elles aussi concernées par une correction éditoriale de leur mRNA.

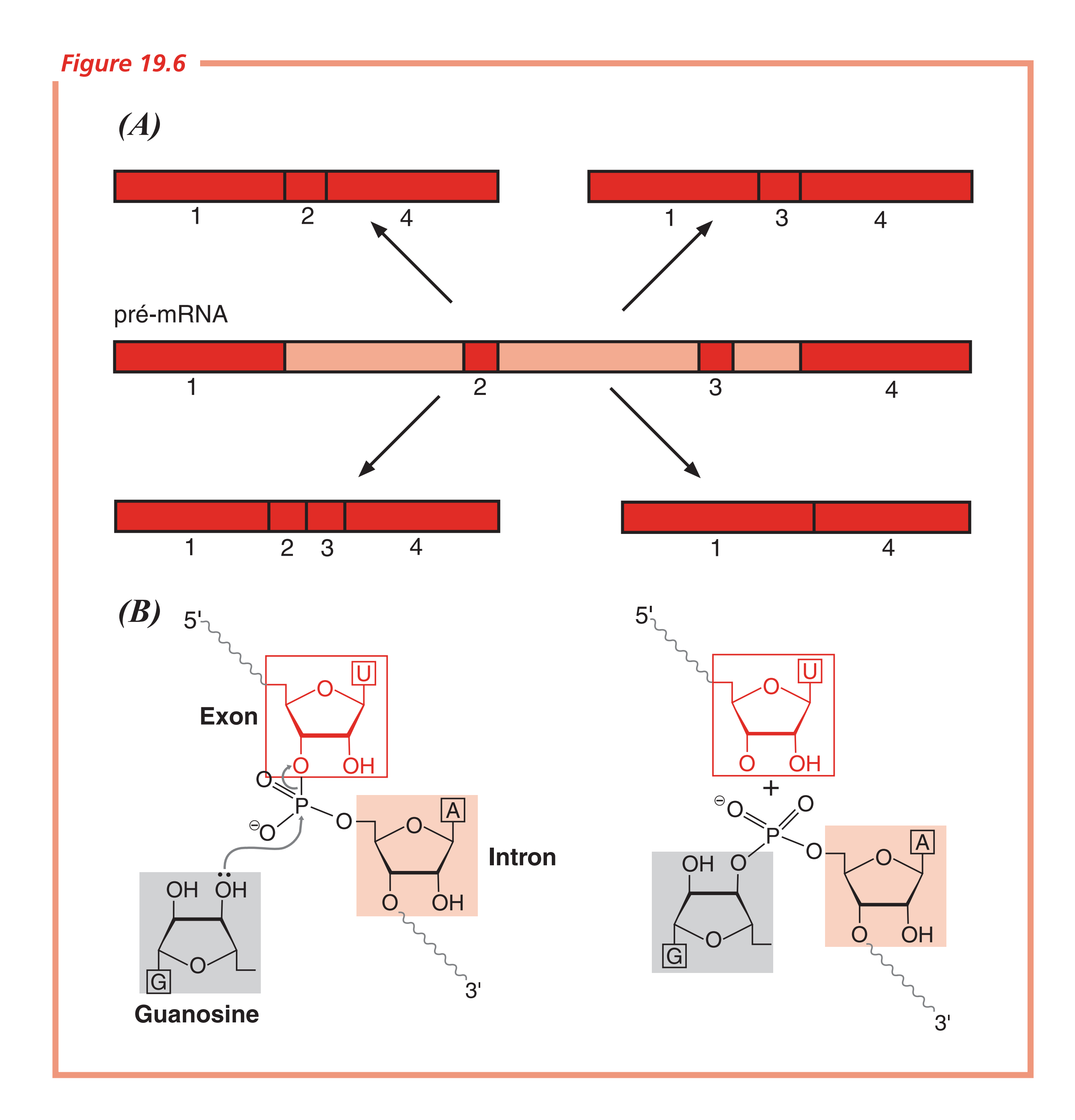
MATURATION DES rRNA ET DES tRNA

Pratiquement tous les RNA subissent une maturation. Chez les Procaryotes et les Eucaryotes, les rRNA dérivent de précurseurs plus longs dénommés RNA préribosomiques ou pré-rRNA. Ainsi, chez les Bactéries, les rRNA 23S, 16S et 5S dérivent d'un précurseur commun de 30S ; chez les Eucaryotes, un précurseur de 45S subit une maturation dans le nucléole pour donner les rRNA 28S, 18S et 5,8S.

Les tRNA viennent eux aussi de précurseurs plus longs ; des nucléotides sont éliminés aux extrémités 5' et 3' et, chez les Eucaryotes, des introns sont excisés. De plus, certains subissent d'autres modifications post-transcriptionnelles telles que l'attachement du trinucléotide 3'-terminal CCA ou la méthylation, la désamination et la réduction de certaines bases.

CERTAINS RNA CATALYSENT L'ÉPISSAGE DES INTRONS

On distingue quatre classes d'introns. Les introns de la classe I sont rencontrés dans certains gènes du noyau, des mitochondries ou des chloroplastes qui codent pour des rRNA, des mRNA et des tRNA. Ceux de la classe II sont habituellement trouvés dans les transcrits primaires des mRNA des mitochondries et des chloroplastes des Algues, des Champignons ou des plantes. Certaines Bactéries possèdent aussi des introns des classes I ou II.



Les RNA des classes I ou II ont la propriété de s'auto-épisser ; aucune protéine enzymatique n'est alors nécessaire. Le mécanisme d'excision-épissage, qui implique toujours lui aussi deux transestérifications, est semblable dans les deux groupes. Cependant, dans le groupe I, il nécessite un cofacteur nucléotidique supplémentaire dérivé de la guanosine (*Figure 19.6.A ou B*) et, dans le groupe II, un résidu adénylique de l'intron lui-même avec formation d'un lasso, comme dans le mécanisme précédemment exposé pour l'excision-épissage des introns spliceosomiques (p. 360).

La découverte fondamentale de l'auto-épissage du RNA en l'absence de toute protéine enzymatique, et donc du pouvoir catalytique propre de ce dernier, a été un événement marquant dans notre compréhension des systèmes biologiques.

RÉGULATION DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION

Les gènes domestiques (*housekeeping genes)*, qui codent pour des protéines indispensables à l'activité cellulaire de base, tels les enzymes des voies métaboliques essentielles, sont exprimés à un niveau plus ou moins constant. En revanche, les gènes non domestiques, qui codent pour des protéines intervenant lors d'événements métaboliques ou ontogéniques déterminés, ne sont exprimés qu'en fonction de l'activité ou du développement d'un organisme. La régulation de leur expression, qui peut être positive (activation) ou négative (répression), s'effectue essentiellement au niveau de l'initiation de la transcription. Cette dernière est alors contrôlée par des protéines spécifiques qui, associées à la RNA polymérase, interagissent avec les gènes ; de telles protéines ont, en effet, des domaines susceptibles de se fixer sur certaines séquences du DNA et des domaines capables d'entrer en interaction avec d'autres protéines.

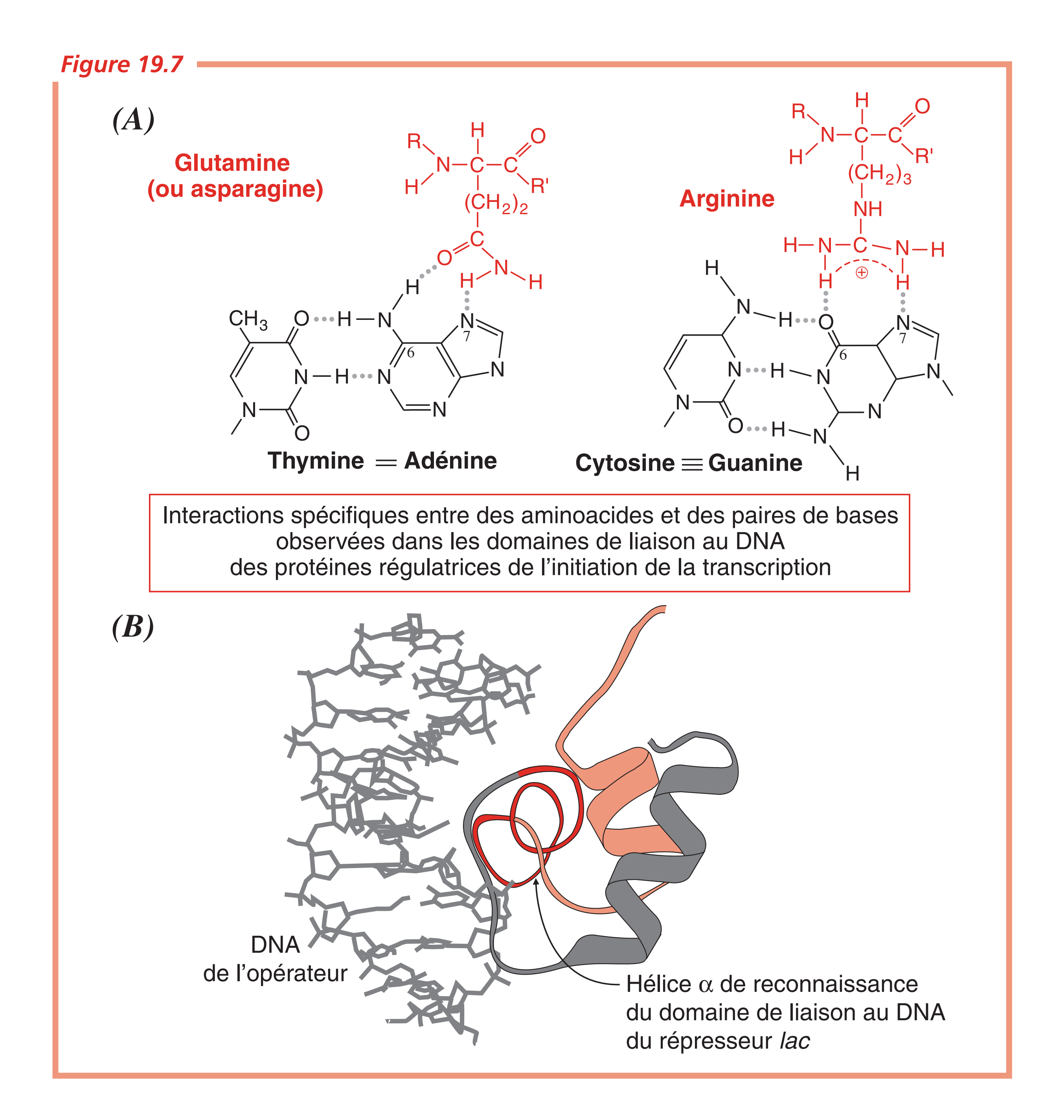
DOMAINES D'INTERACTION PROTÉINES RÉGULATRICES-DNA

Les protéines qui régulent l'initiation de la transcription possèdent des domaines qui se fixent sur des séquences cible du DNA avec une affinité 10^4 à 10^6 fois plus grande que leur affinité pour les autres séquences du DNA. La plupart des atomes ou groupes d'atomes qu'elles reconnaissent au niveau du DNA sont des donneurs ou des accepteurs de liaisons hydrogène présents dans le grand sillon ou le petit sillon (voir la *Figure 2.3C*). Les chaînes latérales des aminoacides des protéines régulatrices qui contractent des liaisons hydrogène spécifiques avec les bases du DNA sont essentiellement celles des résidus Asn, Gln, Glu, Lys et Arg. Ainsi, les deux liaisons hydrogène qui peuvent se former entre Gln et Asn et les N-6 et N-7 de l'adénine ne peuvent pas se former avec une autre base et un résidu Arg peut contracter deux liaisons hydrogène avec le N-7 et le O-6 de la guanine *(Figure 19.7A)*. Cependant, l'examen de la structure de nombreuses protéines possédant un domaine de liaison au DNA montre que ces dernières peuvent reconnaître chaque paire de base de plus d'une façon et qu'il n'y a donc pas de code de reconnaissance aminoacide-base simple. Par ailleurs, pour pouvoir entrer en contact avec le grand sillon, le domaine de liaison au DNA doit être de dimension relativement réduite et faire protrusion à la surface de la protéine.

Sur le DNA, les sites de liaisons pour les protéines régulatrices sont souvent de courtes séquences palindromiques au niveau desquelles plusieurs sous-unités, habituellement deux, de la protéine régulatrice peuvent se fixer de façon coopérative.

Plusieurs motifs de liaison au DNA ont été identifiés ; parmi ces derniers, le motif hélice-coude(tour)-hélice (*helix-turn-helix*), le doigt de zinc (*zinc finger*) et l'homéodomaine de certaines protéines eucaryotes jouent des rôles importants dans les protéines régulatrices de l'initiation de la transcription du DNA.

Figure 19.7



Motif hélice-coude-hélice

Ce motif de liaison au DNA *(Figure 19.7B)* est essentiel pour l'interaction de nombreuses protéines régulatrices de l'initiation de la transcription chez les Procaryotes, mais il est aussi retrouvé chez certains Eucaryotes. Il est constitué d'une vingtaine d'aminoacides répartis en deux hélices de sept résidus chacune, séparées par un coude β. Cette structure n'est que la partie fonctionnelle d'un plus gros domaine de liaison au DNA. L'une des hélices reconnaît une séquence spécifique du DNA. Le répresseur *lac*, entre autres, possède un tel motif (p. 372).

Doigt de zinc

Un motif en doigt de zinc classique est habituellement constitué d'une chaîne polypeptidique d'une trentaine de résidus aminoacide dont deux cystéines et deux histidines sont coordonnées à un ion Zn^{2+} *(Figure 19.8A)*. Sa structure tridimensionnelle, qui se présente comme celle d'une miniprotéine globulaire, possède un motif en épingle à cheveux suivi d'une hélice, souvent de type 3_{10}. Le doigt lui-même, constitué par une douzaine de résidus situés entre la deuxième cystéine et la première histidine, comprend donc le second brin β, la moitié N-terminale de l'hélice et la courte boucle qui les unit. L'hélice s'adapte au grand sillon du DNA et le doigt de zinc est responsable de l'interaction entre la protéine et le DNA. Certains de ses résidus aminoacide, appartenant le plus souvent à la moitié N-terminale de l'hélice, contractent des liaisons spécifiques avec des bases du DNA ; d'autres résidus établissent des liaisons non spécifiques avec les atomes d'oxygène des phosphates.

Certains motifs en doigt de zinc se lient à un site unique du DNA en tant que monomère, d'autres à des séquences palindromiques sous forme de dimère. De nombreux facteurs de transcription possèdent plusieurs doigts de zinc répétitifs qui se disposent selon une hélice qui suit le sillon majeur du DNA et s'y insèrent.

Depuis la description d'un motif en doigt de zinc dans le facteur de transcription TFIIIA de *Xenopus laevis*, il a été décrit de très nombreux facteurs de transcription possédant un tel motif dans leur domaine de liaison au DNA.

Homéodomaine

L'homéobox est une séquence de 180 paires de bases environ qui se trouve dans la région codante de certains gènes. Cette séquence code pour des homéodomaines de 60 résidus aminoacide qui se retrouvent inclus dans certaines protéines *(Figure 19.8B)* où ils se comportent comme les domaines de liaison au DNA.

Une protéine à homéodomaine est constituée de trois hélices α connectées par de courtes boucles *(Figure 19.8C)*. Elle se lie à des segments de DNA contenant la séquence A-T-T-A par un motif hélice-coude-hélice formé des hélices 2 et 3 et de la boucle qui les unit. Les homéodomaines se lient au DNA sous forme de monomère. La reconnaissance du DNA est assumée par l'hélice 3 qui s'insère dans le grand sillon *(Figure 19.8D)*. Le complexe est stabilisé par un grand nombre de ponts salins et de liaisons hydrogène entre le DNA et des résidus basiques, lysine ou arginine, appartenant à l'extrémité N-terminale de la boucle située entre les hélices 1 et 2, ou aux hélices 2 et 3 de la protéine.

Initialement décrites chez la Drosophile, les protéines à homéodomaine servent de régulateurs de l'expression des gènes chez tous les Eucaryotes étudiés, de la levure à l'Homme. Comme les autres facteurs de transcription, *in vivo*, elles n'agissent pas seules, mais en association avec d'autres protéines. Elles sont impliquées, entre autres, dans le développement embryonnaire où elles participent à la formation des organes et finalement à la forme du corps. Cependant, le mécanisme par lequel elles y parviennent reste encore à élucider dans beaucoup de cas.

Figure 19.8

(A)

25 Vers l'extrémité C-terminale
His 23
Cys 6
Zn^{2+}
His 19
Cys 3
1
10
Vers l'extrémité N-terminale

(B)

H_2N
COOH
Région variable
Homéodomaine

(C)

10 Vers l'extrémité N-terminale
1
51
3
38
Vers l'extrémité C-terminale
59
42
2
21
28

(D)

A
T
pb 15 T
A
pb 14 T
A
Gln 50
pb 13 AT
A
Ile 47
pb 12 T
Arg 3
3
Asn 51
2
pb 11
T
Arg 5
A
G C
1
Vers l'extrémité N-terminale

DOMAINES D'INTERACTION PROTÉINE-PROTÉINE

Les protéines régulatrices de l'initiation de la transcription contiennent non seulement des domaines de liaison au DNA mais aussi des domaines d'interaction avec d'autres protéines, telles que d'autres sous-unités de la même protéine régulatrice, la RNA polymérase ou d'autres protéines régulatrices. Ainsi, nombre de facteurs activateurs de la transcription chez les Eucaryotes agissent sous la forme de dimères. Les glissières (ou crémaillères) à leucine *(leucine zipper)* et les motifs hélice-boucle-hélice basiques *(basic helix-loop-helix)* sont deux importants types de ces motifs structuraux.

Motif glissière à leucine

Lorsqu'à l'extrémité C-terminale d'une protéine, la chaîne polypeptidique s'enroule en une hélice α d'une trentaine de résidus aminoacide présentant une leucine tous les sept résidus, soit tous les deux tours d'hélice, un motif leucine zipper est constitué *(Figure 19.9A)*. Si, de plus, ces protéines possèdent un domaine hélicoïdal d'une trentaine de résidus contenant des aminoacides basiques, arginine ou lysine, en continuité avec l'extrémité N-terminale de l'hélice du motif leucine zipper, elles appartiennent à une famille dite b/Z (b pour basique et Z pour leucine zipper).

Dans les facteurs de transcription de la famille b/Z, la fonction du motif leucine zipper est de permettre la formation d'homo- ou d'hétérodimères parallèles par superenroulement des régions en hélice qui le contiennent et d'assurer ainsi une structure tridimensionnelle stable de l'ensemble *(Figure 19.9B)*. La fonction du domaine basique est de fixer le dimère sur des sites spécifiques du DNA, proches des régions du promoteur proximal ou des activateurs *(Figure 19.9C)*.

Les deux hélices des domaines basiques forment une fourche qui passe à travers le grand sillon du DNA, avec une hélice de chaque côté de ce dernier. L'ensemble protéique peut alors transactiver la polymérase II grâce à un domaine d'activation situé vers l'extrémité N-terminale.

De nombreux facteurs de régulation de la transcription appartiennent à la famille b/Z. Parmi ceux-ci, les plus connus sont le facteur de transcription GCN4 qui transactive la biosynthèse des aminoacides chez les Levures *(Figure 19.9D)*, les produits des oncogènes Fos et Jun et le facteur de transcription C/EBP qui déclenche la différentiation des hépatocytes et des adipocytes et régule la réaction inflammatoire aiguë chez les Mammifères.

Figure 19.9

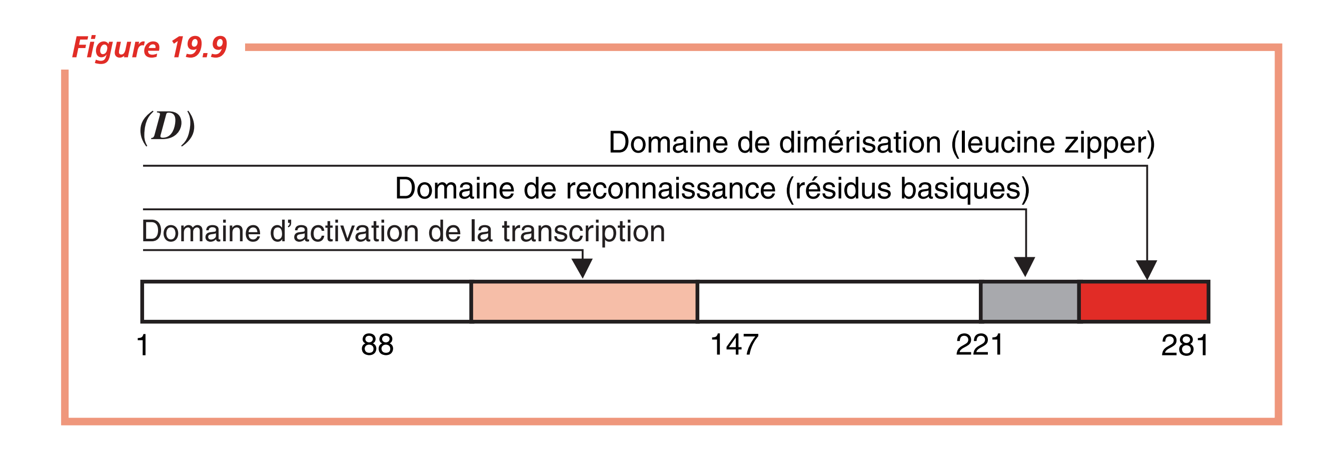
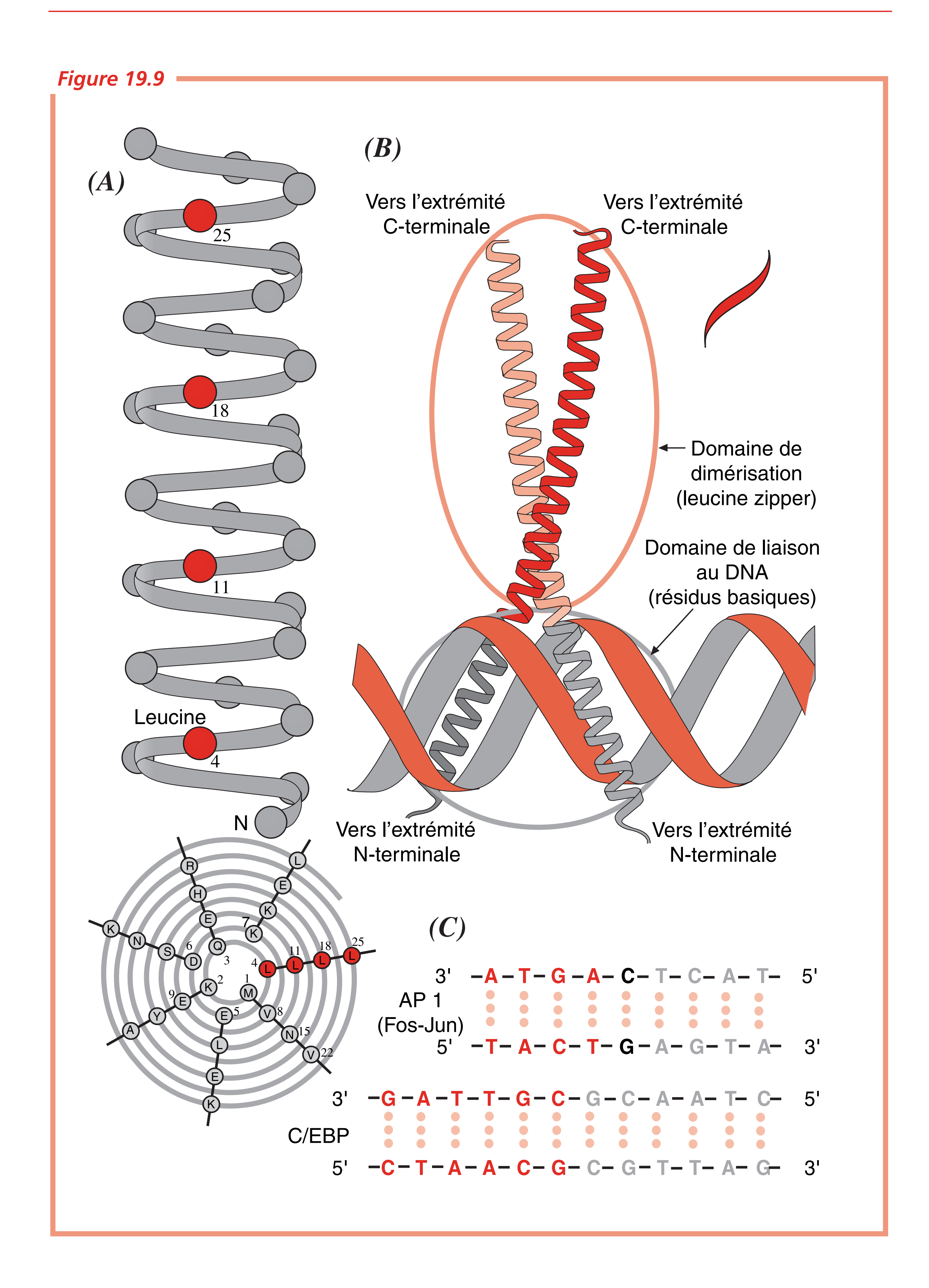


Figure 19.9

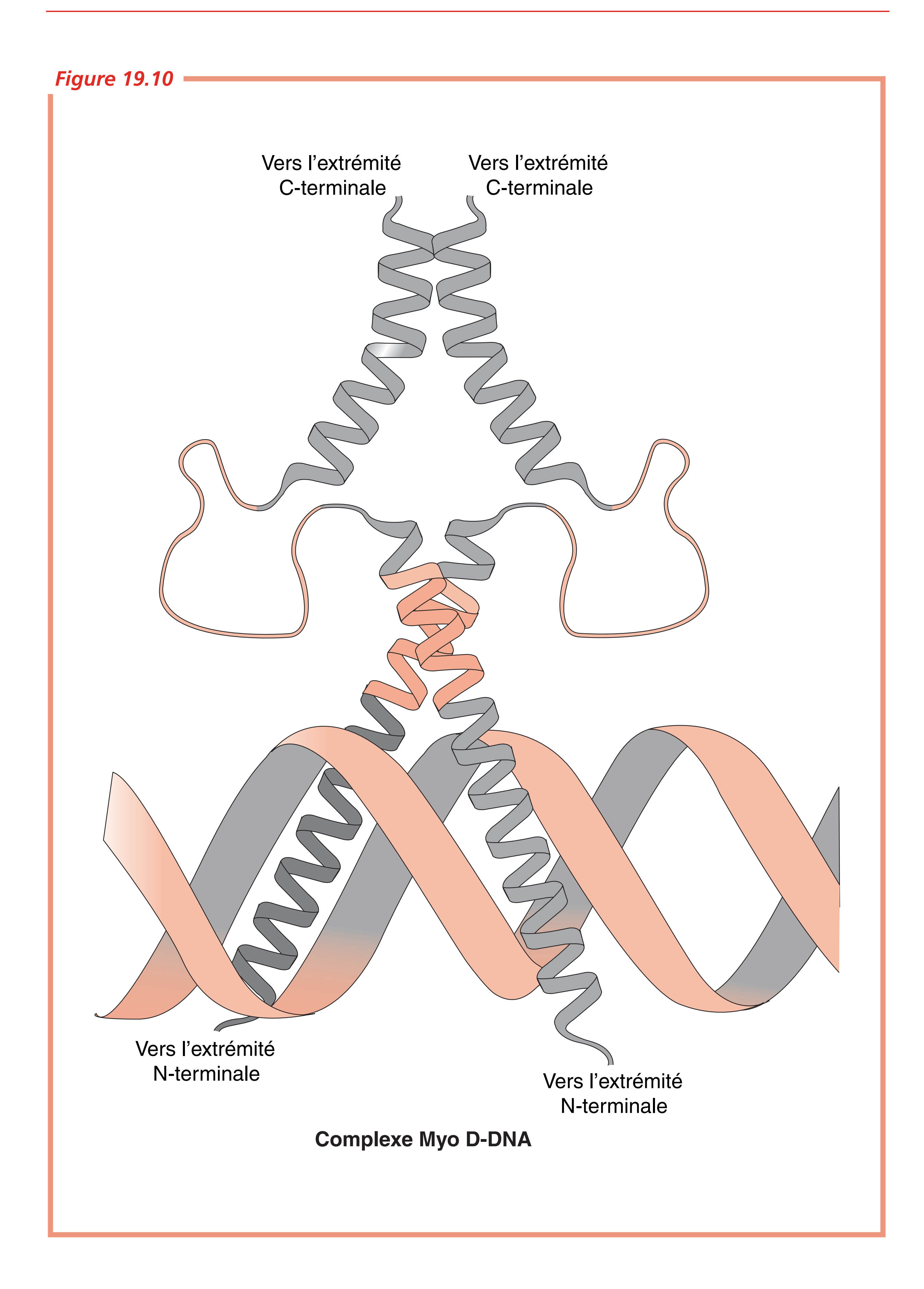

(A)
25
18
11
Leucine
4
N
(B)
Vers l'extrémité C-terminale
Vers l'extrémité C-terminale
Domaine de dimérisation (leucine zipper)
Domaine de liaison au DNA (résidus basiques)
Vers l'extrémité N-terminale
Vers l'extrémité N-terminale
(C)
3' -A-T-G-A-C-T-C-A-T- 5'
AP 1 (Fos-Jun)
5' -T-A-C-T-G-A-G-T-A- 3'
3' -G-A-T-T-G-C-G-C-A-A-T-C- 5'
C/EBP
5' -C-T-A-A-C-G-C-G-T-T-A-G- 3'

Motif hélice-boucle-hélice

Le motif hélice-boucle-hélice, ou HLH, est constitué de deux hélices jointes par une boucle. Lorsqu'il est précédé par une séquence où des résidus aminoacide basiques sont présents, il caractérise une famille de protéines dite b/HLH *(Figure 19.10)*. Le motif HLH permet la formation d'homo- ou d'hétérodimères tandis que le domaine basique assure la liaison de la protéine à la séquence consensus spécifique du DNA 5'-CANNTG-3', connue aussi sous la dénomination de E box, où NN représente deux bases qui sont souvent CG ou GC, mais qui peuvent être quelconques. D'un point de vue structural, l'ensemble b/HLH est donc constitué d'un court segment de résidus hydrophiles, souvent basiques (b), suivi d'un groupe de résidus essentiellement hydrophobes, localisés dans deux courts segments (les hélices 1 et 2), séparés par une séquence non conservée de longueur variable (la boucle).

De nombreux facteurs de régulation de la transcription, qui interviennent dans la modification du programme génétique des cellules en activant ou en réprimant des gènes spécifiques impliqués dans la croissance et la différentiation, appartiennent à la famille b/HLH. Suivant leur programme d'expression, ils peuvent être classés dans deux groupes fonctionnels. Les facteurs de régulation de la transcription du premier groupe, dits de classe A, tels que E12/E47, ITF-1 et ITF-2, sont exprimés de façon pratiquement ubiquitaire. Les facteurs du second groupe, dits de classe B, ne sont exprimés que dans certains types de cellules. Parmi eux, figurent les facteurs myogéniques MyoD, Myf 5, MRF4 et la myogénine, ainsi que des facteurs impliqués dans la neurogenèse ou dans l'hématopoïèse.

Certains facteurs de régulation de la transcription disposent, en plus d'un motif b/HLH, d'un second motif de dimérisation, de type leucine zipper, localisé à leur extrémité C-terminale. Ils forment une famille de protéines dite b/HLH/Z à laquelle appartiennent des facteurs intervenant dans la différentiation, le développement ou le contrôle du métabolisme. Parmi ces facteurs, l'oncogène Myc joue un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération cellulaire ; sa surexpression ou son hyperaction par des mutations conduisent à une prolifération anarchique des cellules et à des néoplasies.


Figure 19.10
Vers l'extrémité C-terminale
Vers l'extrémité C-terminale
Vers l'extrémité N-terminale
Vers l'extrémité N-terminale
Complexe Myo D-DNA

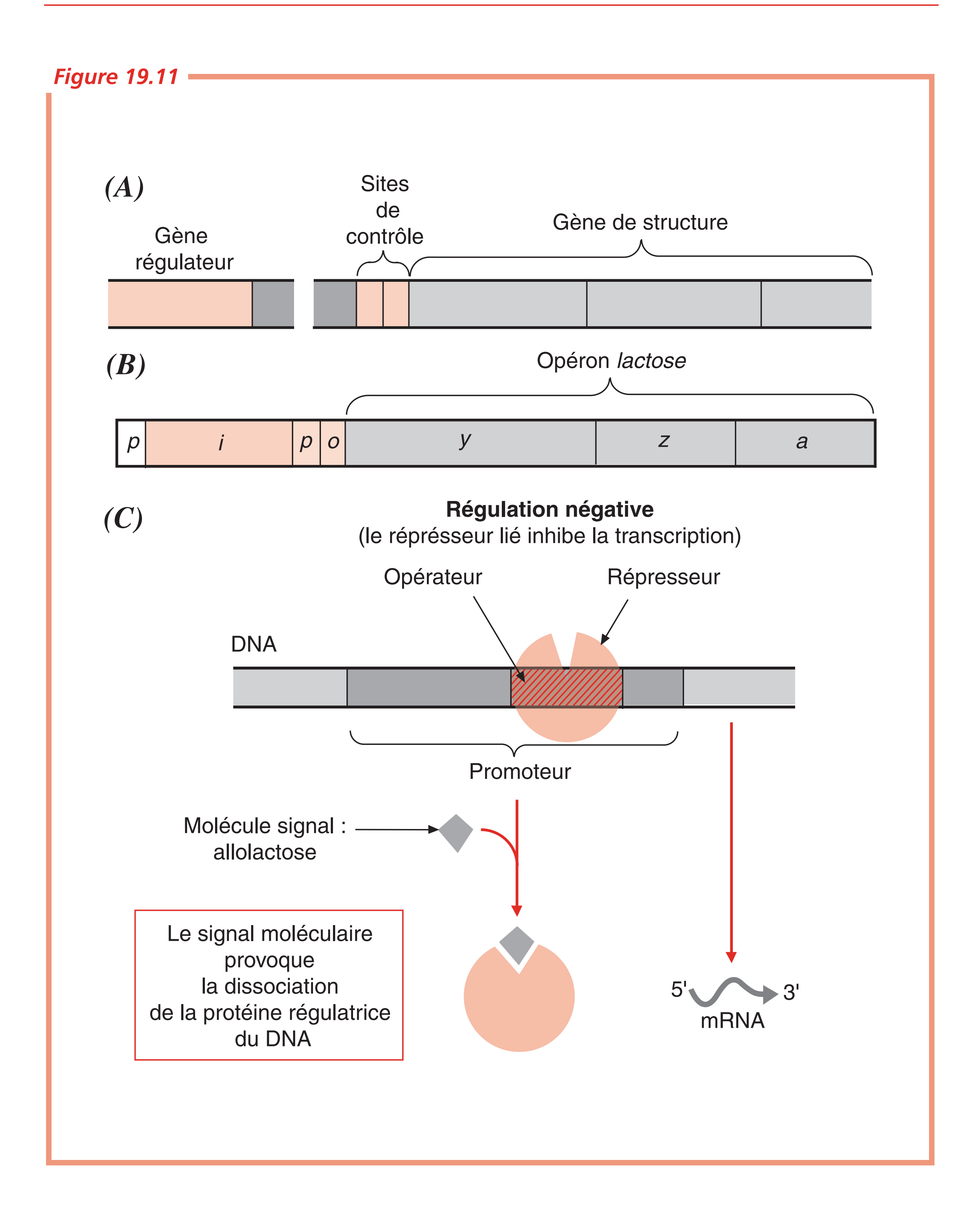
RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION CHEZ LES PROCARYOTES

Chez les Bactéries, les gènes, dits de structure, qui codent pour des protéines participant à un même processus biologique sont regroupés sur un segment du chromosome ; associés à un gène régulateur et à une séquence de DNA régulatrice appelée site opérateur, ils forment un opéron *(Figure 19.11A)*. Le gène régulateur code pour une protéine répresseur qui se fixe sur le site opérateur, ce qui empêche la transcription des gènes de structure. Habituellement, un opéron contient de deux à six gènes, parfois jusqu'à vingt ou même davantage ; ainsi, chez les Procaryotes, nombre de mRNA sont polygéniques (ou polycistroniques).

Le premier opéron a avoir été décrit est l'opéron *lactose* de *E. Coli* qui, lorsque le glucose est rare, permet l'utilisation du lactose comme source de carbone et d'énergie. Une β-galactosidase hydrolyse alors ce disaccharide en glucose et lactose qui sont ensuite métabolisés par les voies décrites précédemment (p. 164 et 174). De plus, une galactoside perméase, qui permet le transport du lactose à travers la membrane de la cellule bactérienne, et une thiogalactoside transacétylase, impliquée dans la détoxication de composés qui pourraient être transportés par la perméase, sont nécessaires au processus et exprimées. Outre le promoteur *p* de l'opéron, l'opéron *lactose* possède un deuxième promoteur devant le gène de régulation *i* pour activer la synthèse du régulateur *(Figure 19.11B)*. Les gènes de structure *z, y* et *a* sont les gènes de structure de la β-galactosidase, de la perméase et de la transacétylase, respectivement.

La régulation de l'opéron *lactose* par la protéine répresseur *lac* est représentée dans la *Figure 19.11C*. En l'absence de la molécule signal, qui est ici l'α-1,6-allolactose, le répresseur *lac* se fixe avec une très forte affinité sur l'opérateur, la constante de dissociation du complexe répresseur-opérateur étant d'environ 0,1 pM ; le répresseur *lac* empêche alors la RNA polymérase de dérouler localement le DNA et les bases qui deviendraient une matrice pour le RNA ne sont pas exposées. Le répresseur *lac* peut exister sous la forme d'un dimère de sous-unités de 37 kDa et deux dimères se mettent souvent ensemble pour former un tétramère. Chaque monomère est constitué d'un gros domaine qui médie la formation du dimère ou du tétramère et d'un petit domaine N-terminal qui se lie au DNA en insérant une hélice α dans le grand sillon ; un résidu arginine de cette dernière contracte deux liaisons hydrogène avec un résidu guanine de l'opérateur *(Figure 19.11D)*. L'expression de l'opéron *lactose* est déclenchée par un inducteur, l'allolactose dans la cellule bactérienne ou un galactoside synthétique tel que l'isopropylthiogalactoside (IPTG) au laboratoire, qui, lorsqu'il se fixe sur le répresseur, diminue l'affinité de ce dernier pour l'opérateur. L'inducteur se fixe sur le grand domaine du répresseur où il induit des changements conformationnels qui conduisent à une réduction de l'affinité de ce dernier pour le DNA. Ainsi, en résumé, pour l'opéron *lactose*, la fixation du répresseur sur l'opérateur empêche la transcription des gènes de structure par la RNA polymérase ; en présence d'un inducteur, la répression de l'opéron est levée.

L'opéron *tryptophane*, qui regroupe les gènes des enzymes nécessaires à la biosynthèse de cet aminoacide, est, un autre exemple d'organisation des gènes dans le chromosome bactérien. Cependant, il est, lui, pleinement fonctionnel lorsque le tryptophane est en très faible concentration dans la cellule ; en revanche, lorsque l'aminoacide est en excès, l'opéron est réprimé.



On peut récapituler en rappelant que l'opéron est une unité de régulation commune aux Procaryotes chez lesquels nombre de réseaux de gènes sont contrôlés selon des voies analogues à celles de l'opéron *lactose* ou de l'opéron *tryptophane*.

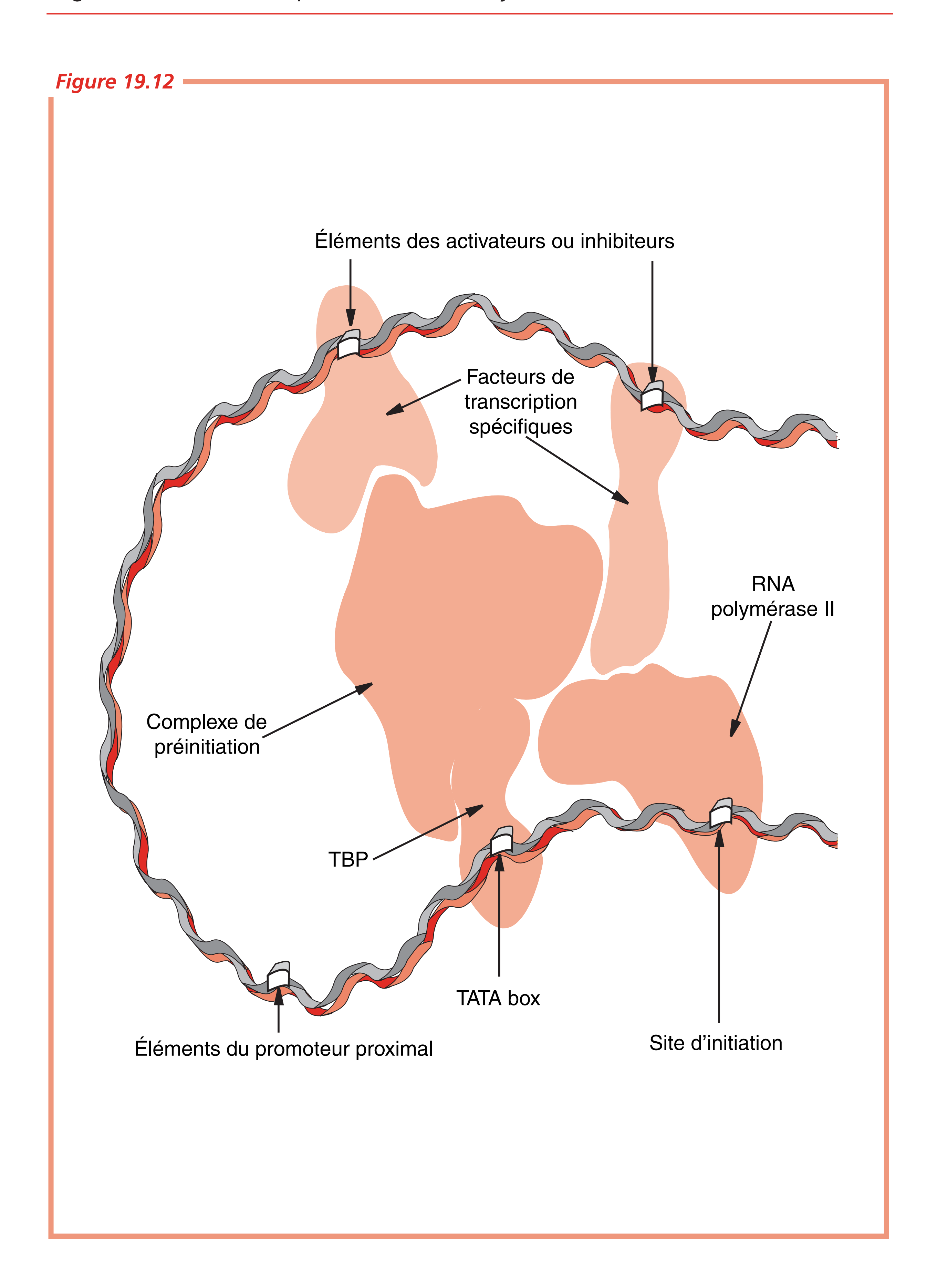
RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION CHEZ LES EUCARYOTES

Chez les Eucaryotes, les mécanismes de régulation de la transcription sont beaucoup plus complexes que chez les Procaryotes. En effet, non seulement le génome à réguler est beaucoup plus grand et n'est pas organisé en opérons, mais les gènes qui codent pour les protéines intervenant dans un même processus biologique sont souvent largement dispersés dans le génome. De plus, la transcription et la traduction ne sont pas couplées. Enfin, les chromosomes des Eucaryotes ne sont pas nus, mais étroitement liés à des protéines basiques dénommées histones.

Les Eucaryotes ont trois RNA polymérases : I, II et III et seule la RNA polymérase II transcrit les gènes qui codent pour les protéines en unissant des nucléotides qui constitueront un mRNA. Elle ne se fixe pas directement sur le DNA et son activité est contrôlée par un ensemble de facteurs protéiques, dénommés facteurs de transcription, qui reconnaissent des séquences spécifiques du DNA. L'ensemble constitué par ces séquences spécifiques, auxquelles se lient des facteurs spécifiques de transcription, forme un module de contrôle dénommé complexe d'initiation *(Figure 19.12)*.

Le DNA d'un module de contrôle présente trois régions principales, ou éléments, le promoteur basal (*basal promoter element*), le promoteur proximal (*promoter proximal element*) et les activateurs ou inhibiteurs distaux (*enhancers* ou *silencers*). Le promoteur basal le mieux caractérisé est la TATA box reconnue par la TBP qui sert de plateforme pour l'assemblage d'autres facteurs de transcription avec lesquels elle forme le complexe spécifique de la RNA polymérase II (p. 356). Associée à ce complexe, la RNA polymérase II peut se fixer sur le site d'initiation où elle assurera la séparation des brins à transcrire puis la formation de la première liaison phosphodiester entre les deux premiers nucléotides du mRNA. Le promoteur proximal, qui s'étend sur une longueur d'environ 100 à 200 paires de bases, est situé au voisinage du site d'initiation de la transcription. Il contient des séquences de DNA qui sont reconnues spécifiquement par divers facteurs de transcription. Enfin, les activateurs et les inhibiteurs sont des régions du DNA, souvent situées très en amont ou en aval du site d'initiation, qui présentent de courtes séquences reconnues par des facteurs de transcription spécifiques.

Ainsi, chez les Eucaryotes, l'expression des gènes est contrôlée par une suite de séquences de DNA, dites facteurs cis, reconnues spécifiquement par des protéines capables de se lier à elles, dites facteurs trans. Ces protéines sont nombreuses et la transcription est toujours contrôlée par une combinaison de plusieurs facteurs. Par conséquent, l'expression des gènes ne peut avoir lieu que lorsque ces derniers sont tous présents dans la cellule.


Figure 19.12
Éléments des activateurs ou inhibiteurs
Facteurs de transcription spécifiques
RNA polymérase II
Complexe de préinitiation
TBP
TATA box
Éléments du promoteur proximal
Site d'initiation

SUPERFAMILLE DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

Les cellules somatiques reçoivent nombre de signaux externes qui déterminent leur comportement par l'expression de fonctions spécialisées ou l'initiation de cycles de division cellulaire, entre autres. Certains de ces signaux, tels que les facteurs de croissance, les hormones peptidiques ou les neuromédiateurs, sont détectés par des récepteurs spécifiques de la membrane plasmique et interprétés par une cascade d'événements moléculaires déclenchée par l'interaction signal-récepteur. Un autre groupe de molécules porteuses d'un signal traverse la membrane cellulaire et active directement des récepteurs moléculaires localisés essentiellement dans le noyau. Les mieux connues des molécules agissant par l'intermédiaire de ces derniers sont les hormones stéroïdes et des morphogènes tels que les hormones thyroïdiennes et des rétinoïdes, parmi lesquels figurent des dérivés des vitamines A et D (p. 338 et 335). Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transactivation qui agissent sur l'expression de gènes spécifiques.

Les récepteurs nucléaires sont des protéines constituées de cinq ou six domaines distincts, notés de A à F, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale *(Figure 19.13)*. Le domaine A/B est le moins conservé d'un récepteur à un autre et les différences de longueur de cette région N-terminale sont à l'origine des variations considérables de taille des différents récepteurs. Il semble qu'il soit impliqué dans l'activation de la transcription. Le domaine C, très conservé et d'une longueur d'environ 70 résidus aminoacide, est le domaine de liaison au DNA. Le domaine E, assez conservé et d'une longueur d'environ 250 résidus aminoacide, est le domaine de liaison au ligand. Le domaine D, situé entre les deux précédents, sert de charnière et semble jouer un rôle important dans la configuration spatiale du récepteur.

Interaction des récepteurs avec le DNA

Les premières études des récepteurs des hormones stéroïdes ont montré que la liaison du ligand sur le récepteur induit une transformation qui active la fixation de ce dernier sur le DNA. Par la suite, il a été démontré l'existence de séquences de DNA spécifiques sur lesquelles se fixent les récepteurs. Ces dernières, dénommées élément de réponse à l'hormone ou HRE (de *hormone response element*), sont généralement situées en amont du site d'initiation de la transcription et présentent deux courts segments de 5 à 6 paires de bases d'une séquence très semblable, séparés ou non par un court segment non conservé, dénommé espaceur (*spacer*). Ainsi, dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes ou GRE (de *glucocorticoid response element*) *(Figure 19.14)*, chaque hexanucléotide se lie à une molécule de récepteur et les deux molécules de récepteur juxtaposées forment un dimère.

Figure 19.14

5' -A-G-A-A-C-A-N-N-N-T-G-T-T-C-T- 3'
3' -T-C-T-T-G-T-N-N-N-A-C-A-A-G-A- 5'

5' -A-G-G-T-C-A-N-N-N-T-G-A-C-C-T- 3'
3' -T-C-C-A-G-T-N-N-N-A-C-G-G-T-A- 5'

5' -A-G-G-T-C-A-
3' -T-C-C-A-G-T-



Figure 19.13
Liaison du DNA
Liaison du ligand
A / B
C
D
E
F
185 315 553
1 66 595 ER
567 687
1 66 933 PR
421 532
1 66 777 GR
Isoformes
603 738
1 66 984 MR
558 669
1 66 918 AR
24 196
1 66 427 VitD3
53 189 371
1 68 490 TRα
Isoformes
102 238 420
1 68 456 TRβ
88 200 420
1 66 462 RARα
Isoformes avec des régions AB différentes
81 193 413
1 66 448 RARβ
90 202 422
1 66 454 RARγ
OH
HO
R
(R)
O
OH
OH
HO
I
I
I
HO
O
CH2-CH-COOH
NH2
all-*trans*-RA ; se lie aux RAR
COOH
9-*cis*-RA ; se lie aux RAR
COOH

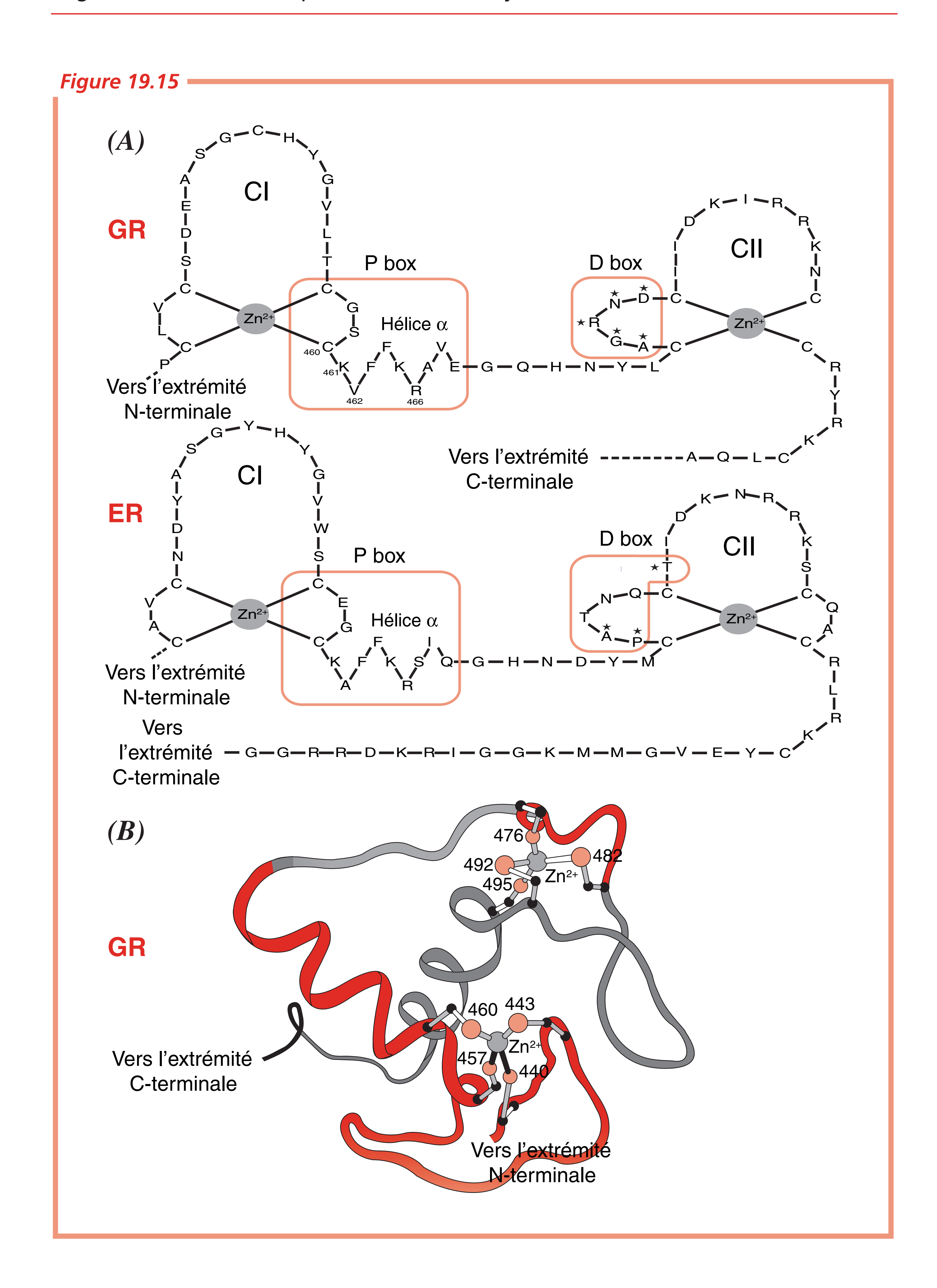
Domaine de liaison au DNA

La séquence des aminoacides du domaine de liaison au DNA de nombre de récepteurs a été établie. L'analyse structurale de cette région très conservée révèle la présence de deux boucles, contenant chacune quatre résidus cystéine, qui établissent des liaisons de coordinence avec un ion Zn^{2+} pour former des motifs en doigt de zinc *(Figure 19.15A)*. Les structures tridimensionnelles du domaine de liaison au DNA des récepteurs des glucocorticoïdes et des œstrogènes ont été déterminées. Dans le cas du premier, par exemple, les deux doigts de zinc ne sont pas séparés mais inclus dans une structure globulaire qui présente deux hélices α *(Figure 19.15B)*.

La reconnaissance spécifique des éléments de réponse à l'hormone par les récepteurs nucléaires est assurée par certains résidus aminoacide d'une hélice du domaine de liaison au DNA, parfois dénommée P box. Dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes GR, cette hélice, constituée des résidus 457 à 469, est située à la fin du doigt de zinc N-terminal. Elle établit des interactions uniquement avec le grand sillon. Elle est placée en position favorable par des interactions non spécifiques entre des chaînes latérales de la protéine et des phosphates du squelette du DNA. Trois de ses résidus, Lys461, Val462 et Arg466, établissent des contacts spécifiques avec les bords de certaines bases du GRE. Ces trois mêmes résidus aminoacide sont retrouvés dans les récepteurs MR, PR et AR et ils reconnaissent la même séquence consensus. Lys461 et Arg466 sont conservées de façon absolue dans la superfamille des récepteurs nucléaires, où ils reconnaissent les mêmes bases, mais Val462 ne l'est pas.

Les récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes se fixent uniquement sous forme d'homodimères aux éléments de réponse dont les demi-sites sont palindromiques. L'interaction spécifique entre les deux molécules de récepteur fixées à un même élément de réponse à l'hormone est favorisée par la présence de cinq résidus aminoacide formant une boucle à la partie N-terminale du deuxième doigt de zinc ; cette boucle est parfois dénommée D box (D pour dimérisation). Les autres récepteurs nucléaires forment des hétérodimères avec le récepteur de l'acide *cis*-rétinoïque ; le nombre des paires de bases servant d'espaceur est alors variable selon les récepteurs.

Enfin, il convient de remarquer que la structure quaternaire du complexe DNA-protéine est en partie induite et stabilisée par la liaison des deux composants, comme si le DNA se comportait comme un effecteur allostérique de sa propre reconnaissance par le domaine de liaison d'un récepteur nucléaire.


Figure 19.15
(A)
GR
CI
P box
Hélice α
D box
CII
Zn2+
Vers l'extrémité N-terminale
Vers l'extrémité C-terminale
ER
CI
P box
Hélice α
D box
CII
Zn2+
Vers l'extrémité N-terminale
Vers l'extrémité C-terminale
(B)
GR
476
492
495
482
Zn2+
460
443
457
440
Vers l'extrémité C-terminale
Vers l'extrémité N-terminale

Récepteurs nucléaires et régulation de la transcription

La liaison d'un récepteur nucléaire à un élément de réponse conduit habituellement à une activation de la transcription, mais une inhibition n'est pas exceptionnelle. Les récepteurs nucléaires entrent en interaction avec les autres facteurs de transcription pour activer la transcription en contribuant à stabiliser le complexe de préinitiation, y compris la TBP et la RNA polymérase II, fixé au niveau des séquences promotrices. Dans ce contexte, les récepteurs nucléaires pourraient contribuer à plier le DNA. L'inhibition de l'expression de certains gènes par des récepteurs nucléaires peut, elle aussi, résulter d'interactions protéine-protéine. Ainsi, GR peut inhiber la capacité d'AP1, l'hétérodimère constitué des produits des proto-oncogènes cFos et cJun, de transactiver les promoteurs de ses gènes cible et, réciproquement, AP1 peut réprimer l'activité de GR.

Deux domaines TAF (de *transcription activation function*) sont susceptibles d'activer l'initiation de la transcription au niveau des promoteurs liés à un HRE. L'un, TAF1, est situé dans la région N-terminale A/B et l'autre, TAF2, dans le domaine de liaison à l'hormone E de GR, ER et PR, où deux segments acides sont impliqués dans la fonction de transactivation. Bien que chacun de ces deux TAF puisse agir seul, la présence des deux confère au récepteur une activité supérieure à la somme des deux, ce qui traduit une coopérativité entre les deux domaines. L'efficacité des domaines TAF1 et TAF2 dépend des promoteurs et du contexte cellulaire. De plus, elle est fonction de la concentration des autres facteurs, en particulier de ceux qui sont en quantité limitée.

Les récepteurs des hormones stéroïdes non liés à leur hormone sont essentiellement localisés dans le noyau des cellules, où ils ont été transportés grâce à la présence de séquences de localisation nucléaire, souvent riches en résidus lysine et arginine. Dans le noyau, les récepteurs des hormones stéroïdes non liés à leur hormone ne sont pas fixés au DNA, vraisemblablement en raison de l'interaction de leur région C-terminale au niveau de TAF2, avec la protéine hsp 90 (de *heat shock protein*).

Chapitre 20

Biosynthèse des protéines

Les protéines sont les agents moléculaires des performances téléonomiques des êtres vivants. Elles traduisent, selon un code génétique universel, l'information génétique contenue dans le DNA puis transcrite dans les mRNA. Elles sont synthétisées en fonction des besoins des cellules, transportées vers leur localisation cellulaire, puis dégradées lorsqu'elles ne sont plus nécessaires.

La biosynthèse des protéines s'effectue au sein des ribosomes, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale. C'est le processus le plus complexe effectué au sein des cellules ; ainsi chez les Eucaryotes, outre les mRNA, il implique d'une part plus de 40 RNA de transfert ou ribosomiques différents et, d'autre part, de très nombreuses protéines : plus de 20 enzymes pour activer les aminoacides constitutifs, plus de 70 protéines ribosomiques différentes, des facteurs protéiques d'initiation, d'élongation ou de terminaison, des enzymes dévolus à diverses autres fonctions et enfin des dizaines d'enzymes pour les transformations post-synthétiques.

Bien qu'il s'agisse d'un processus continu, on peut considérer que la biosynthèse des protéines est réalisée en cinq phases successives : activation des aminoacides, initiation, élongation, terminaison et enfin reploiement et modifications post-traductionnelles de la chaîne polypeptidique.

L'appareil biosynthétique des protéines représente une part importante de la cellule, plus d'un tiers de leur poids chez les Bactéries, et il mobilise les neuf dixièmes de l'énergie chimique utilisée pour les biosynthèses. La biosynthèse des protéines, malgré sa grande complexité et bien qu'elle soit précisément régulée par des processus élaborés, s'effectue très rapidement, en quelques secondes.

La biosynthèse des protéines est confiée à un gigantesque RNA doué de propriétés enzymatiques, ce qui met en évidence que les processus catalytiques ne sont pas exclusivement dévolus aux protéines et qu'un monde à RNA à vraisemblablement précédé le monde à DNA tel qu'il nous apparaît actuellement.

Le processus biosynthétique le plus étudié est celui des Bactéries ; il sera pris ici comme modèle, mais les caractères propres aux Eucaryotes seront aussi évoqués.

LE CODE GÉNÉTIQUE

Le code génétique est la relation entre la séquence des bases des mRNA, et donc du DNA, et celle des aminoacides des protéines. Un groupe de trois bases, ou codon, code pour un aminoacide. Il y a 64 codons possibles : 61 codent pour des aminoacides et 3, dénommés codons stop, pour la terminaison de la traduction. Ainsi, la plupart des aminoacides sont codés par plus d'un codon (*Tableau 20.1*) et le code est donc largement dégénéré. Cette dégénérescence du code génétique a pour effet de minimiser les effets délétères des mutations. De plus, le code génétique est non chevauchant, n'a pas de ponctuation et il est quasiment universel.

LES RIBOSOMES

Les ribosomes sont les machines moléculaires complexes responsables de la synthèse des protéines. Ils sont constitués de deux sous-unités qui peuvent se dissocier puis s'associer à nouveau. Chez les Bactéries, ils ont un diamètre de 18 nm, un coefficient de sédimentation de 70S et contiennent 65 % de RNA et 35 % de protéines ; les deux sous-unités séparées ont des coefficients de sédimentation de 50S et 30S. Chez les Eucaryotes, ils ont un coefficient de sédimentation de 80S et leurs deux sous-unités des coefficients de sédimentation de 60S et 40S. La constitution des ribosomes en RNA et en protéines est donnée dans le *Tableau 20.2*.

Lors de ces dernières années, la structure à haute résolution des sous-unités des ribosomes a été élucidée (*Figure 20.1*), ce qui a permis de confirmer que le ribosome est un ribozyme. Les deux sous-unités, de forme irrégulière, s'adaptent l'une à l'autre mais néanmoins délimitent une cavité où passe le mRNA quand le ribosome se déplace le long de ce dernier lors de la biosynthèse d'une chaîne polypeptidique. Elles présentent trois sites : E, P et A, qui jouent un rôle majeur dans le processus synthétique.

Tableau 20.2

RNA et protéines des ribosomes

	Sous-unité	RNA			Protéines	
		Nbre	Type	Nbre de nucléotides	Nbre	Désignation
Ribosome 70S des Bactéries M_r 2,7•10^6	30S	1	rRNA 16S	1540	21	S1-S21
	50S	1 1	rRNA 23S rRNA 5S	3200 120	36	L1-L36
Ribosome 80S cytoplasmique des Mammifères M_r 4,2•10^6	40S	1	rRNA 18S	1900	33	
	60S	1 1 1	rRNA 28S rRNA 5,8S rRNA 5S	4700 160 120	49	

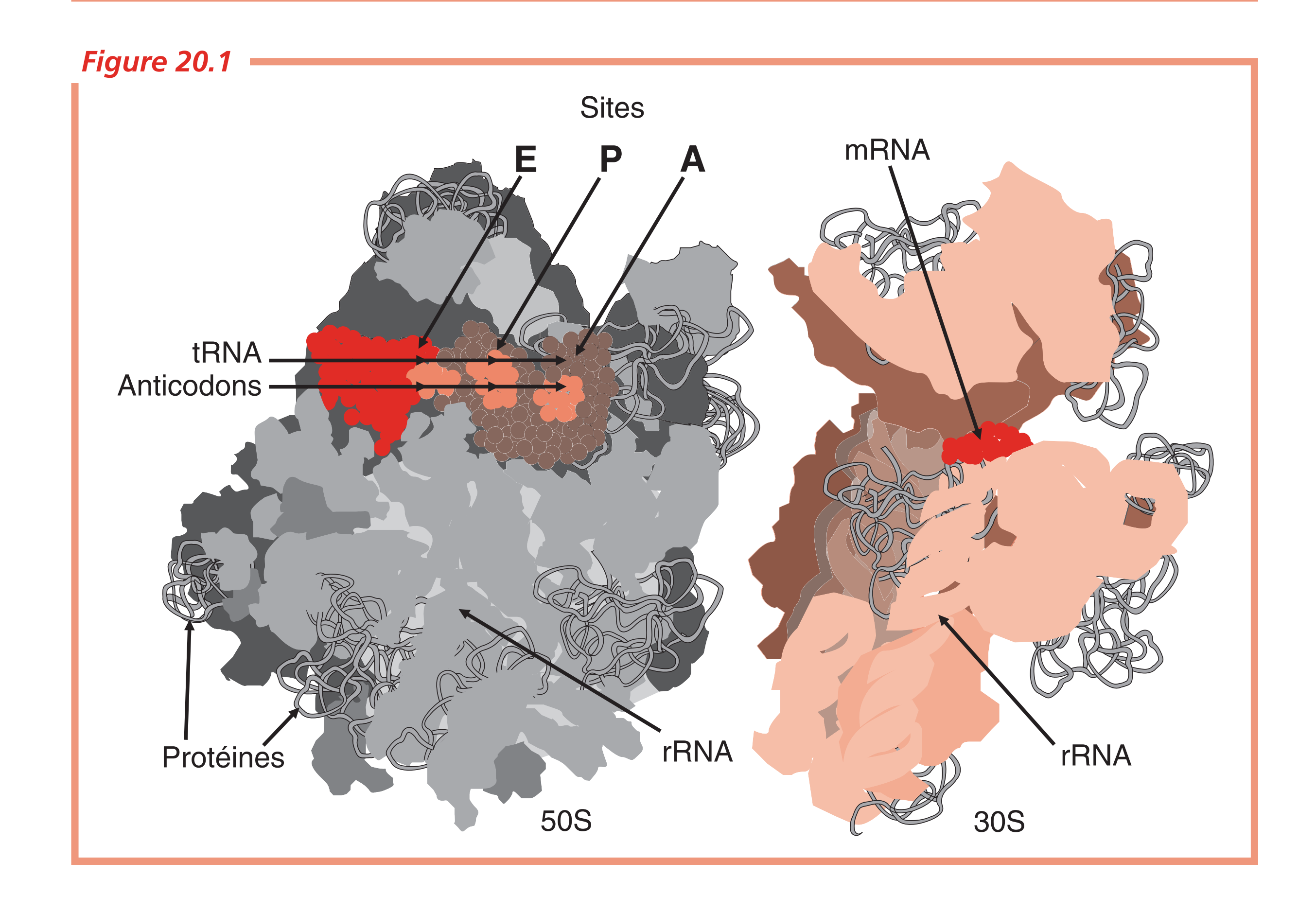
Tableau 20.1

Code génétique standard

UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GUa	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

AUG fait partie du signal d'initiation mais est aussi un codon pour la méthionine

Figure 20.1



ACTIVATION DES AMINOACIDES

Pour synthétiser une chaîne polypeptidique d'une séquence donnée, le groupe carboxyle de chaque aminoacide doit être activé pour permettre la formation d'une liaison peptidique mais, de plus, une étroite relation doit être établie entre le mRNA porteur de l'information génétique et chaque aminoacide. Ces deux conditions sont satisfaites lorsque chacun des 20 aminoacides est fixé de façon rigoureusement spécifique par une aminoacyl-tRNA synthétase à un tRNA qui joue alors le rôle de molécule adaptatrice. L'activation des aminoacides a lieu dans le cytoplasme ; elle fait intervenir 20 aminoacyl-tRNA synthétases, plus de 30 tRNA et les 20 aminoacides ; de plus, elle nécessite de l'ATP et des ions Mg^{2+}.

Les aminoacyl-tRNA synthétases catalysent l'estérification fortement exergonique des aminoacides par leurs tRNA correspondants :

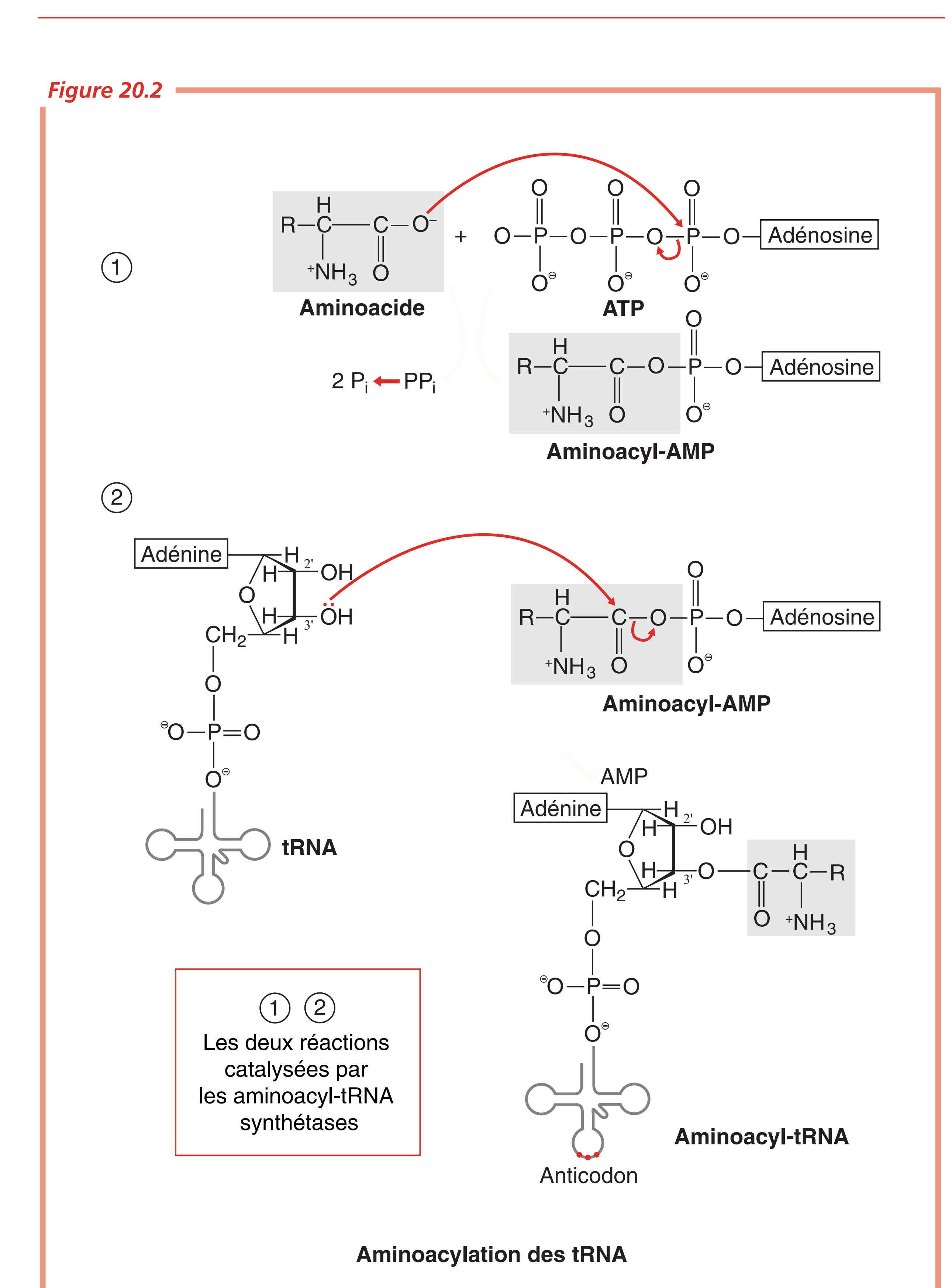
$$\text{Aminoacide + tRNA + ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{aminoacyl-tRNA + AMP + 2P}_i \quad \Delta G°' = -29 \text{ kJ/mol}$$

Le processus fait intervenir une seule molécule d'ATP mais est assuré par l'hydrolyse du pyrophosphate ; deux liaisons de haute énergie sont donc consommées. La réaction s'effectue en deux étapes au sein du site actif de l'enzyme (*Figure 20.2*). Tout d'abord, l'aminoacide est activé par adénylation avec formation d'un aminoacyl adénylate, ou aminoacyl-AMP, et de PP_i. Puis, le groupe aminoacyle est transféré sur le tRNA correspondant pour donner l'aminoacyl-tRNA.

Il existe une aminoacyl-tRNA synthétase pour chaque aminoacide. Les aminoacyl-tRNA synthétases sont chacune très spécifiques d'un aminoacide et d'un ou plusieurs tRNA appropriés. En effet, elles ont des sites d'activation de l'aminoacide très sélectifs ; une synthétase n'incorpore un aminoacide incorrect qu'une fois toutes les 10^4 ou 10^5 réactions catalytiques. Pour les aminoacides susceptibles d'être estérifiés par deux ou plusieurs tRNA, habituellement le même enzyme catalyse toutes les réactions. De plus, les aminoacyl-tRNA synthétases reconnaissent très précisément la boucle de l'anticodon et le bras accepteur des tRNA ; il s'agit là, en quelque sorte, d'un « second code génétique ». Une telle reconnaissance précise par les aminoacyl-tRNA synthétases des aminoacides et de leurs tRNA est essentielle pour la fidélité de la synthèse des protéines.

Les aminoacyl-tRNA synthétases se répartissent en deux classes caractérisées chacune par des différences de structure et de mécanisme réactionnel. Ainsi, celles de la classe I acylent le groupe 2'-hydroxyle de l'adénosine terminale du tRNA, tandis que celles de la classe II acylent le groupe 3'-hydroxyle ; cependant, le produit final est toujours le même, acylé sur le groupe 3'-hydroxyle, en raison d'une transestérification finale.

Figure 20.2



Aminoacylation des tRNA

INITIATION

La biosynthèse des protéines s'effectue de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale. En fait, elle ne débute pas immédiatement à l'extrémité 5' du mRNA ; le premier codon traduit est toujours distant de l'extrémité 5' d'au moins une vingtaine de nucléotides et tous les mRNA contiennent des signaux d'initiation.

Chez les Bactéries, l'initiation de la biosynthèse des protéines nécessite la formation d'un complexe d'initiation qui s'effectue en trois étapes (*Figure 20.3*) et met en œuvre successivement la sous-unité 30S du ribosome, le mRNA qui code pour la chaîne polypeptidique à synthétiser, l'aminoacyl-tRNA initiateur fMet-$tRNA^{fMet}$, un groupe de trois protéines dénommées facteurs d'initiation IF-1, IF-2 et IF-3, le GTP, la sous-unité 50S du ribosome et des ions Mg^{2+}.

Lors d'une première étape, la sous-unité 30S du ribosome fixe les deux facteurs d'initiation IF-1 et IF-3, ce dernier empêchant la sous-unité 50S de se fixer prématurément. Le mRNA se met alors en place sur la sous-unité 30S, le codon initiateur (5')AUG étant guidé vers sa position correcte sur le rRNA 16S de la sous-unité 30S par la séquence consensus de Shine-Dalgarno du mRNA. Cette dernière, riche en purines, est centrée à environ 10 nucléotides sur l'extrémité 5' du codon initiateur ; elle s'apparie à une séquence riche en pyrimidines de l'extrémité 3' du rRNA 16S de la sous-unité 30S.

Les ribosomes bactériens ont trois sites susceptibles de fixer les aminoacyl-tRNA, le site A pour « aminoacyl », le site P pour « peptidyl » et le site E pour « *exit* ». Les sites A et P sont formés par les sous-unités 30S et 50S, tandis que le site E est pratiquement localisé au niveau de la seule sous-unité 50S. Le codon initiateur (5')AUG est positionné en regard du site P, le seul site sur lequel fMet-$tRNA^{fMet}$ puisse se fixer. Les sites A, P et E pontent donc les deux sous-unités des ribosomes. Un tunnel connecte le site P à la partie postérieure du ribosome ; la chaîne polypeptidique passe par ce tunnel pendant sa synthèse.

Lors de la deuxième étape, le complexe se complète par la fixation de IF-2 liée au GTP et de l'aminoacyl-tRNA initiateur fMet-$tRNA^{fMet}$, ce dernier s'appariant au codon initiateur (5')AUG.

Lors de la troisième étape, la sous-unité 50S rejoint le complexe ainsi complété ; le GTP est hydrolysé et les facteurs d'initiation libérés. Le ribosome 70S ainsi constitué devient le complexe d'initiation fonctionnel.

Chez les Eucaryotes, comme nous le verrons, la traduction dans son ensemble est assez semblable à celle des Procaryotes, sauf en ce qui concerne le mécanisme de l'initiation qui est plus complexe. Il n'y a pas de séquence de type Shine-Dalgarno, mais il intervient de nombreuses protéines spécifiques dont la plupart se fixent aux extrémités 5' et 3' du mRNA.



Figure 20.3

Formation du complexe d'initiation

ÉLONGATION

La troisième phase de la biosynthèse des protéines est celle de l'élongation au cours de laquelle la chaîne polypeptidique naissante est allongée par la fixation covalente de résidus aminoacyle. Chacun de ces derniers est correctement apporté et positionné sur le ribosome par l'intermédiaire de son tRNA qui s'apparie au codon correspondant du mRNA. L'élongation s'effectue en trois étapes (*Figure 20.4*) et met en œuvre le complexe d'initiation décrit précédemment, des aminoacyl-tRNA et un groupe de trois protéines cytosoliques solubles dénommées facteurs d'élongation EF-Tu, EF-Ts et EF-G et de GTP. Ces trois étapes sont répétées autant de fois qu'il y a de résidus à ajouter.

Lors d'une première étape, l'aminoacyl-tRNA approprié se lie au complexe EF-Tu–GTP et l'ensemble ainsi réalisé se fixe sur le site A du complexe d'initiation. Le GTP s'hydrolyse et le complexe EF-Tu–GDP est éliminé du ribosome ; il sera régénéré en vue d'un nouveau cycle au cours d'un processus impliquant EF-Ts et le GTP.

Lors d'une seconde étape, une liaison peptidique se forme entre les deux aminoacides fixés aux sites A et P par leurs tRNA. Le groupe α-amine du second aminoacide effectue l'attaque nucléophile du carboxyle du premier aminoacide, ce qui conduit à la formation d'un dipeptidyl-tRNA situé dans le site A et du $tRNA^{fMet}$ désacylé. L'activité enzymatique qui catalyse la formation de la liaison peptidique a été initialement attribuée à une peptidyl transférase ; on sait maintenant que la réaction est catalysée par le rRNA 23S agissant comme ribozyme.

L'étape finale du cycle d'élongation est une translocation au cours de laquelle le ribosome se déplace vers l'extrémité 3' du mRNA. Le dipeptidyl-tRNA passe donc dans le site P, le tRNA désacylé dans le site E d'où il est rapidement expulsé vers le cytoplasme et le troisième codon du mRNA se trouve alors dans le site A. Le mouvement du ribosome nécessite l'intervention de EF-G agissant comme translocase et de l'énergie apportée par l'hydrolyse du GTP. Ainsi, deux molécules de GTP sont hydrolysées pour chaque résidu aminoacyle ajouté. Le ribosome est maintenant prêt pour un nouveau cycle d'élongation débutant par la fixation d'un nouvel aminoacyl-tRNA sélectionné par le troisième codon du mRNA. La phase d'élongation se poursuit jusqu'à l'addition du dernier résidu aminoacyle codé par le mRNA.

Chez les Eucaryotes, la phase d'élongation est très semblable à celle des Procaryotes qui vient d'être décrite. Cependant, les ribosomes eucaryotes n'ont pas de site E ; les tRNA non chargés sont directement expulsés du site P.



Étapes de l'élongation

TERMINAISON

La quatrième phase de la biosynthèse des protéines est celle de la terminaison qui est signalée par l'un des trois codons non-sens du mRNA, UAA, UAG ou UGA, situé immédiatement après celui du dernier aminoacide codé. Chez les bactéries, ces codons sont reconnus par des facteurs de terminaison appelés RF (de *Release Factor*) (*Figure 20.5*) ; RF-1 reconnaît UAA et UAG, RF-2 UAA et UGA. Un troisième facteur, RF-3, n'a pas de fonction spécifique connue. Les trois facteurs de terminaison participent à l'hydrolyse du peptidyl-tRNA terminal lié, à la libération de la chaîne polypeptidique libre et du dernier tRNA du site P et à la dissociation du ribosome 70S en ses sous-unités 30S et 50S qui sont alors prêtes pour un nouveau cycle biosynthétique.

Chez les Eucaryotes, un seul facteur de terminaison, eRF-1 reconnaît les trois codons non-sens.

REPLOIEMENT DE LA CHAÎNE POLYPEPTIDIQUE ET MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

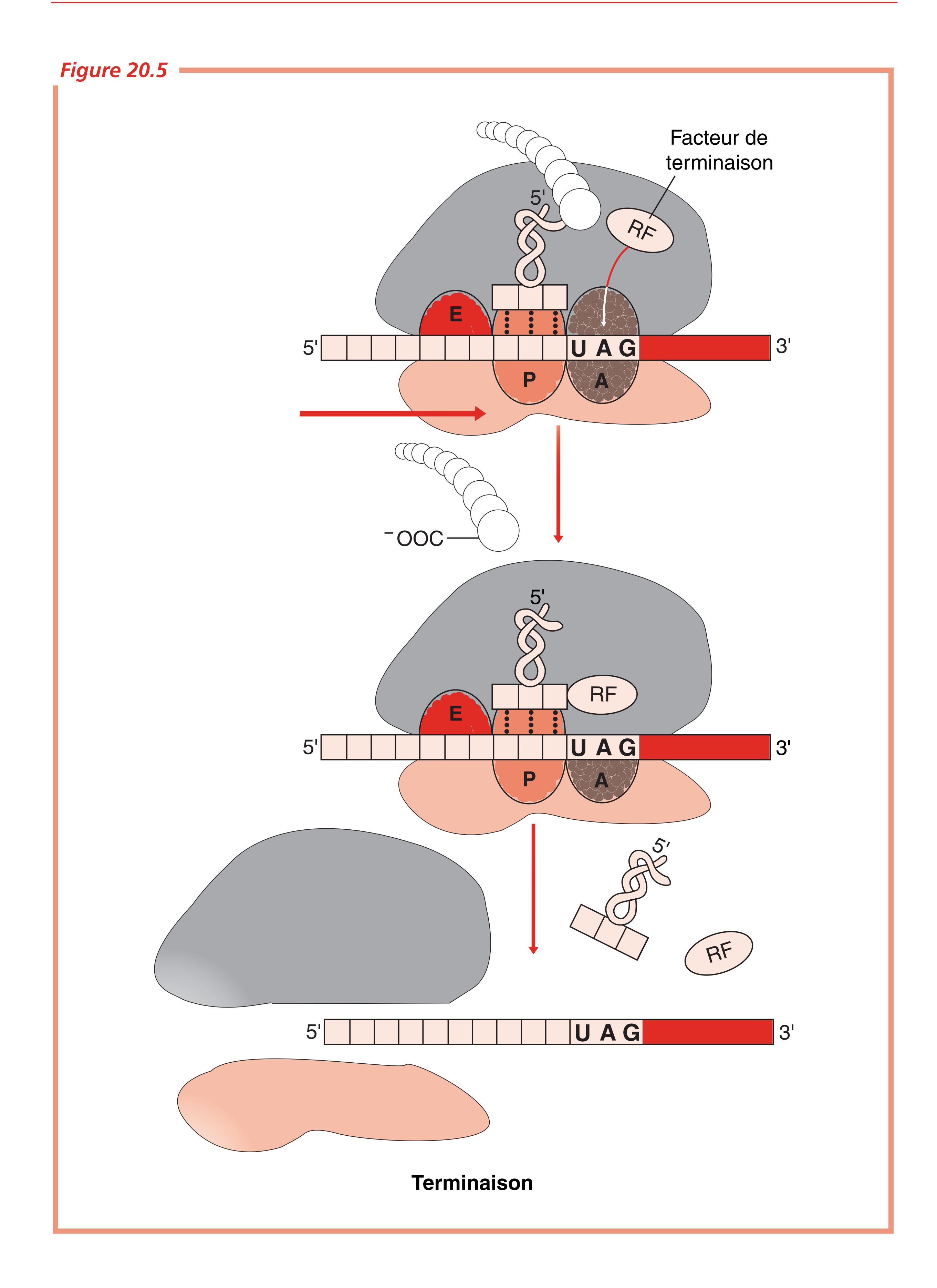
La dernière phase de la biosynthèse des protéines voit le reploiement de la chaîne polypeptidique naissante déterminé par l'information contenue dans la séquence unidimentionnelle des aminoacides qui ont des propensions différentes à former des hélices, des feuillets plissés ou des coudes (p. 24).

De plus, nombre de protéines sont l'objet de modifications post-traductionnelles qui leur permettent d'atteindre leur conformation biologique active. Ces dernières, très diverses, peuvent consister en la formation d'une ou plusieurs liaisons disulfure (p. 29), en l'élimination de l'aminoacide N-terminal (la *N*-formylméthionine chez les Bactéries ou la méthionine chez les Eucaryotes) ou C-terminal, en la phosphorylation de résidus Ser, Thr ou Tyr (p. 152), en la carboxylation de résidus Glu ou la méthylation de certains résidus Lys, en la perte d'une séquence signal, en l'addition de groupes prosthétiques ou de chaînes osidiques (p. 74), en l'activation protéolytique d'un précurseur inactif avec perte de toute une partie de la séquence (p. 152).

RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES

Le coût énergétique de la synthèse des protéines est élevé. Dans tous les organismes connus, une régulation de cette dernière permet d'optimiser l'utilisation de l'énergie cellulaire disponible, tout en assurant la présence des protéines nécessaires à des concentrations adaptées. En fait, tous les processus qui participent à la synthèse et à la durée de vie des protéines sont impliqués dans l'obtention de cet équilibre, tant au niveau de la transcription : synthèse du transcrit primaire, modifications post-transcriptionnelles du mRNA, dégradation de ce dernier, que de la synthèse de la protéine elle-même, traduction, modifications post-traductionnelles, ou que de son adressage, son transport et sa dégradation.

Figure 20.5



Terminaison

PARTIE V

BIOMOLÉCULES ET ENVIRONNEMENT

Toute cellule, qu'elle constitue à elle seule un individu ou qu'elle ne soit que l'un des éléments d'un être complexe, échange en permanence des métabolites, de l'énergie et des informations avec son environnement. Dans les précédents chapitres de ce livre, nous avons déjà envisagé nombre d'aspects de cette dynamique. Cependant, beaucoup d'autres relations des êtres vivants avec leur milieu restent à examiner. Dans cette Partie V, nous en retiendrons deux, parmi les plus fondamentales : l'oxygénation de la cellule et la défense immunitaire de l'individu.

Dès le précambrien, il y a plus de deux milliards et demi d'années, les Cyanobactéries ont inventé le processus pourtant très complexe de la photosynthèse, ce qui a rempli l'atmosphère d'oxygène. La présence de ce gaz très toxique pour les micro-organismes d'alors a changé fondamentalement les conditions de vie sur notre planète. Des Bactéries se sont adaptées à la présence de ce nouvel élément et, en devenant aérobies, elles se sont avérées capables de l'utiliser pour créer de l'énergie avec une efficacité beaucoup plus grande que celle des Bactéries demeurées anaérobies. Il y a deux milliards d'années, presque tous les Eucaryotes ont hébergé les descendantes de ces Bactéries aérobies précambriennes. Elles y sont devenues les mitochondries qui, en rendant possible l'oxydation de nombreux métabolites par l'oxygène moléculaire, produisent l'essentiel de l'énergie chimique utilisable par les cellules. L'oxygène moléculaire était devenu, au même titre que les nutriments, l'un des éléments primordiaux de l'environnement qu'il convenait d'apporter au sein d'organismes toujours plus complexes grâce à des protéines spécialisées toujours plus performantes, telles que les hémérythrines, les hémocyanines et enfin les hémoglobines. Simultanément à cette complexité biochimique, une complexité anatomo-physiologique s'est développée, ce qui a permis d'optimiser le transport de l'oxygène de l'environnement vers les tissus, même les plus profonds, chez les êtres les plus volumineux.

Les êtres vivants sont en permanence au contact d'une incroyable diversité d'autres êtres vivants, tels que les Virus, les Bactéries, les Champignons et les Parasites, dont la plupart trouveraient, au sein du milieu intérieur ou des cellules des premiers, les conditions idéales pour leur développement. Des défenses multiples et adaptées sont donc indispensables à la survie de tout organisme. Elles sont apparues progressivement au cours de l'évolution et chez les Mammifères elles culminent avec l'organisation de deux systèmes interdépendants, l'immunité innée et l'immunité acquise, d'une complexité inouïe, capables de protéger contre tous les intrus connus et même contre les intrus inconnus potentiels, même si ces derniers ne doivent jamais exister.

L'objet de cette Partie V est précisément d'examiner le rôle joué par des biomolécules fondamentales telles que les hémoglobines et les protéines de la famille des immunoglobulines dans ces deux aspects des rapports entre les organismes et leur environnement que sont, d'une part, le transport de l'oxygène moléculaire au plus profond des cellules et, d'autre part, le maintien de l'intégrité des individus évolués en réponse aux innombrables agressions des micro-organismes compétiteurs.

Chapitre 21

Oxygène : transport et mise en réserve

La création d'ATP, énergie directement utilisable par les cellules, met en œuvre des processus divers et complexes. Ceux qui font intervenir l'oxydation de certains métabolites par l'oxygène moléculaire sont parmi les plus efficaces et les plus largement utilisés. Ainsi, dans de nombreux organismes dits aérobies la vie nécessite un mécanisme qui assure le transport de l'oxygène du milieu extérieur vers le milieu cellulaire et, éventuellement, sa mise en réserve dans les cellules. Chez les êtres de faible activité ou de petite dimension, une simple diffusion peut assurer une concentration suffisante en oxygène. Dans le règne animal, au cours de l'évolution, l'accroissement de l'activité ou l'augmentation de la taille ont nécessité l'apparition de structures qui augmentent les capacités d'oxygénation.

Pour atteindre un tel objectif, les Insectes ont créé un système purement anatomique, constitué de tubes trachéens pénétrant à l'intérieur de leur organisme. Au cours de l'évolution, un autre processus, fondé sur la combinaison réversible de l'oxygène moléculaire et d'une protéine, s'est progressivement imposé. Les Invertébrés ont adopté diverses protéines de masse moléculaire élevée, telles que les hémérythrines et les myohémérythrines, constituées de chaînes polypeptidiques entourant deux atomes de fer, les érythrocruorines qui possèdent du fer héminique, les hémocyanines qui contiennent du cuivre, toutes librement dispersées dans le milieu intérieur. Les Vertébrés ont opté pour des chaînes polypeptidiques, dites globines, de masse moléculaire moins élevée, de 17 kDa environ, qui adoptent toutes le même type de reploiement, peuvent s'unir à un hème et sont capables de s'associer entre elles pour former des protéines allostériques. Pour mettre à profit de telles propriétés, ils ont dû développer simultanément un appareil respiratoire et un appareil cardio-vasculaire plus ou moins complexes.

MÉCANISME MOLÉCULAIRE DU TRANSPORT DE L'OXYGÈNE

Selon un mécanisme commun, un complexe oxygène-protéine se forme à la pression partielle d'oxygène qui règne dans le milieu où évolue l'animal ; il se dissocie aux pressions partielles d'oxygène plus basses du milieu intérieur de ce dernier. Chez les animaux évolués, ce mécanisme a été porté à un haut niveau d'efficacité par la concentration de la protéine de transport dans des cellules spécialisées, les globules rouges, ainsi que par le développement d'un appareil respiratoire qui met en contact la protéine avec l'oxygène du milieu ambiant et d'un appareil circulatoire qui transporte le complexe oxygène-protéine vers les tissus où s'effectuent les oxydations (*Figure 21.1A*). Ainsi, chez les animaux supérieurs, l'oxygène est fixé par l'hémoglobine des globules rouges qui se transforme en oxyhémoglobine au niveau des alvéoles pulmonaires. Cette dernière se dissocie en oxygène moléculaire et désoxyhémoglobine dans les organes où elle est amenée par les artères. Dans les cellules musculaires dont l'activité est conditionnée par un apport continu et important d'oxygène, les grandes quantités d'oxygène nécessaires aux oxydations métaboliques sont mises en réserve par la myoglobine.

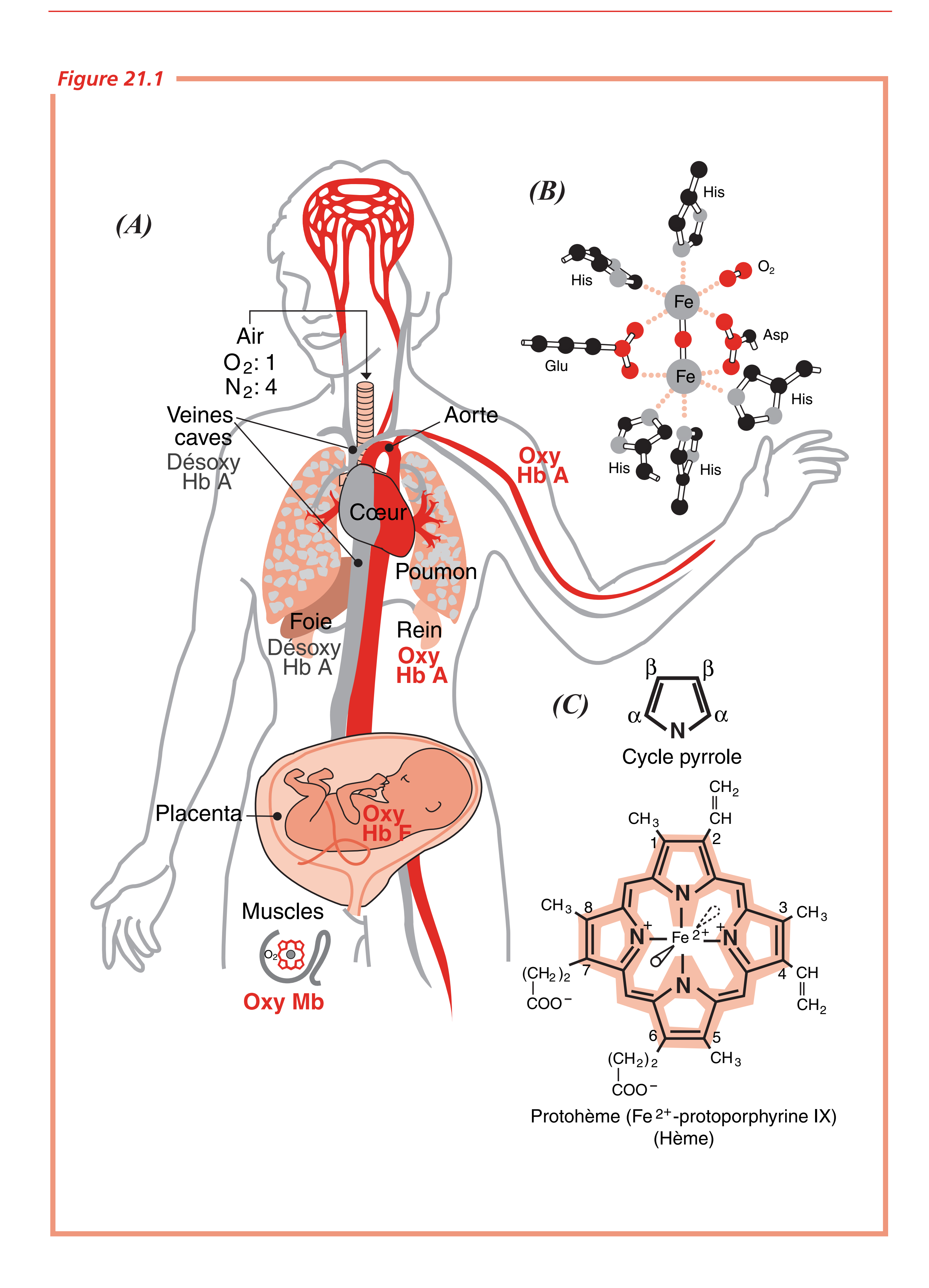
RÔLE DU FER DANS LE TRANSPORT DE L'OXYGÈNE

Dans beaucoup de complexes formés réversiblement entre l'oxygène moléculaire et une protéine, le fer, isolé du milieu ambiant par l'environnement protéique, apparaît comme un élément essentiel.

Dans les myohémérythrines et les hémérythrines, deux atomes de fer unis par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène constituent le site actif (*Figure 21.1B*). Ce centre bimétallique est situé au sein d'un faisceau de quatre hélices α auxquelles il est souvent uni par des résidus histidine.

Dans les myoglobines et les hémoglobines, un atome de fer héminique, enfoui dans la zone hydrophobe interne d'une globine, est le centre actif (*Figure 21.1C*). Quatre cycles pyrrole s'unissent au niveau de leurs carbones α par des ponts méthène pour former un cycle tétrapyrrolique dénommé porphyne. Ce cycle est plan et les électrons π des doubles liaisons conjuguées y sont délocalisés et répartis sur tous les atomes de carbone, d'azote et d'hydrogène. Les hydrogènes des carbones β de la porphine peuvent être substitués par divers radicaux et les composés qui en résultent sont dénommés porphyrines, dont de très nombreux isomères sont possibles. Les porphyrines sont susceptibles de se complexer avec différents métaux, en particulier le fer. Dans ce cas, la porphyrine donne naissance à un hème lorsque l'atome de fer est au niveau d'oxydation + 2 (Fe^{2+}), ou à une hématine lorsqu'il est au niveau d'oxydation + 3 (Fe^{3+}). La stéréochimie du fer, quel que soit le niveau d'oxydation de ce dernier, est octaédrique ; quatre liaisons, situées dans le plan du cycle tétrapyrrolique, unissent l'atome de fer aux atomes d'azote des quatre pyrroles ; les deux autres liaisons, qui donc pointent dans des directions opposées, perpendiculaires au plan du cycle tétrapyrrolique, permettent l'union de l'hème avec différentes structures, comme il sera montré prochainement (p. 398). L'hème des myoglobines et des hémoglobines normales dérive de la protoporphyrine IX caractérisée par la présence de huit substituants : quatre méthyles en 1, 3, 5 et 8, deux vinyles en 2 et 4 et deux propionates en 6 et 7. Ce protohème est souvent appelé simplement hème.

Figure 21.1


(A)
Air
O2 : 1
N2 : 4
Veines caves
Désoxy Hb A
Aorte
Oxy Hb A
Cœur
Poumon
Foie
Désoxy Hb A
Rein
Oxy Hb A
Placenta
Oxy Hb F
Muscles
O2
Oxy Mb
(B)
His
His
O2
Fe
Asp
Glu
Fe
His
His
His
(C)
β β
α α
N
Cycle pyrrole
CH2
CH
CH3
CH3
CH3
CH
CH2
(CH2)2
COO−
(CH2)2
COO−
CH3
N
N+
Fe 2+
N+
N
Protohème (Fe 2+-protoporphyrine IX)
(Hème)

LE REPLOIEMENT GLOBINIQUE, MOTIF STRUCTURAL COMMUN

Le reploiement globinique est l'une des plus importantes et des mieux connues des structures α (p. 00). Très conservé, il est constamment retrouvé dans les globines des myoglobines et les hémoglobines, entre autres, dont les structures tridimensionnelles ont été déterminées à haute résolution par diffraction des rayons X.

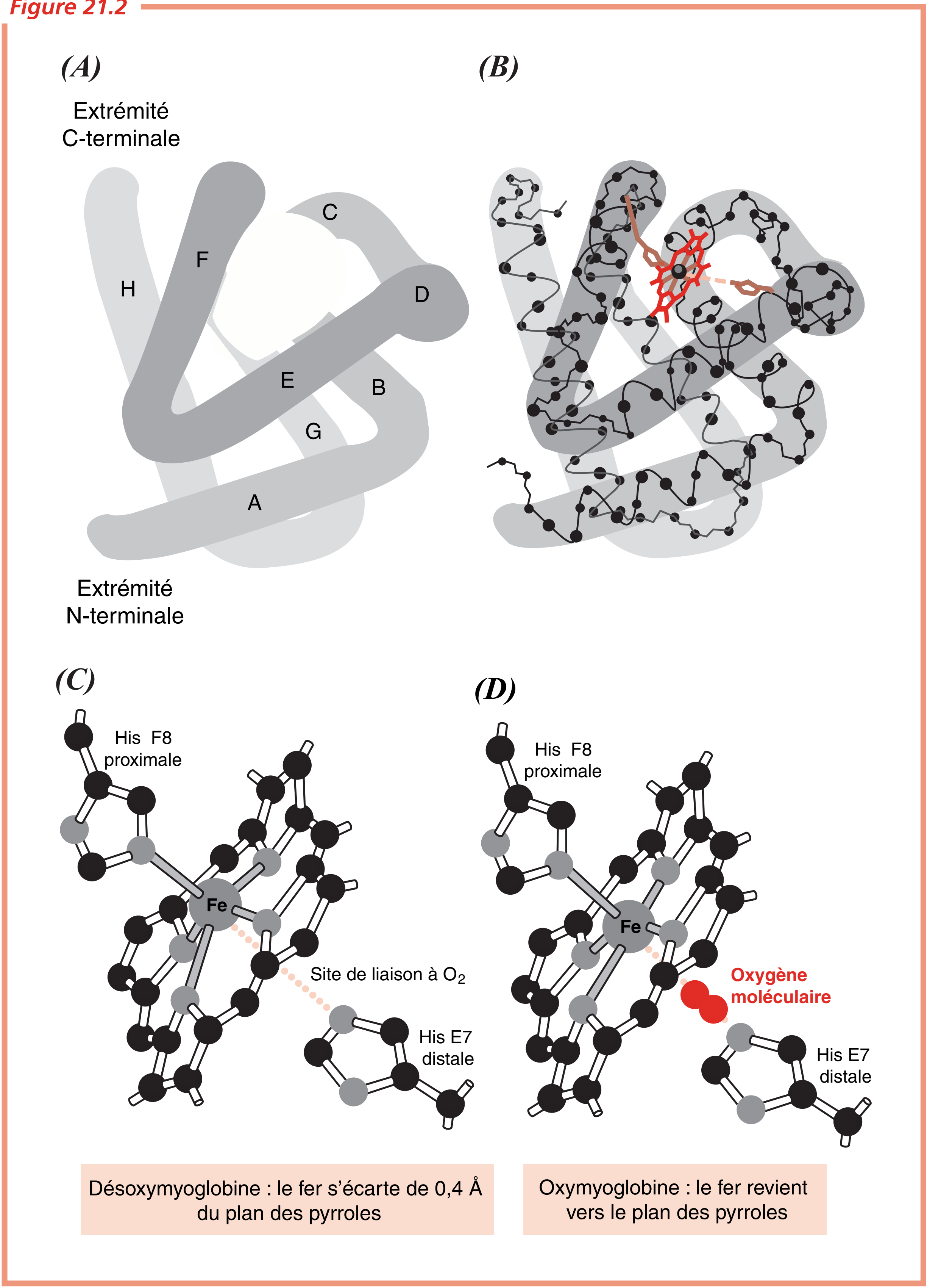
Le reploiement globinique est une structure compacte constituée de huit hélices α, désignées de A à H, connectées par de courtes boucles (*Figure 21.2A*). Dans la plupart des globines, 75 % environ des résidus aminoacide sont inclus dans les hélices dont la longueur peut aller de sept résidus pour la plus courte, l'hélice C, à vingt-huit pour la plus longue, l'hélice H ; plusieurs d'entre elles sont interrompues par un résidu proline (p. 00). Les hélices sont disposées de façon à former une zone interne, tapissée presque entièrement de résidus hydrophobes et limitée latéralement par les hélices E et F, où peut se loger l'hème. Par ailleurs, les résidus aminoacide polaires hydrophiles sont répartis à la surface de la structure globinique.

STRUCTURE DES MYOGLOBINES ET OXYMYOGLOBINES

La myoglobine du muscle squelettique est constituée d'une chaîne polypeptidique, dénommée globine, de 153 résidus aminoacide chez l'Homme, et d'un hème. Sa structure tridimensionnelle a été déterminée par diffraction des rayons X ; la chaîne polypeptidique adopte le reploiement globinique pour donner une protéine de forme globulaire de 45 × 35 × 25 Å (*Figure 21.2B*). L'hème s'insère dans la zone hydrophobe interne, avec ses deux propionates au niveau de la surface de la protéine.

Le fer héminique (*Figure 21.2C*) contracte une liaison avec une histidine de l'hélice F (F8), dite histidine proximale, qui l'attire hors du plan du cycle tétrapyrrolique, dont il se trouve écarté de 0,3 Å environ. De plus, le fer héminique se trouve en regard d'une histidine de l'hélice E (E7), dite histidine distale. L'espace entre le fer héminique et cette dernière est susceptible de fixer réversiblement une molécule d'oxygène (*Figure 21.2D*). En présence d'oxygène, la désoxymyoglobine se transforme en oxymyoglobine, la fixation de O_2 s'accompagnant d'un mouvement du fer qui revient dans le plan du cycle tétrapyrrolique. Seul le fer à l'état ferreux est capable de fixer O_2 ; le fer à l'état ferrique ne le peut pas. Ainsi, il apparaît que l'un des rôles essentiels de la globine est de prévenir l'oxydation du fer ferreux de l'hème et la formation d'une ferrimyoglobine inactive.

Figure 21.2


(A)
Extrémité
C-terminale
C
F
H
D
E
B
G
A
Extrémité
N-terminale
(B)
(C)
His F8
proximale
Fe
Site de liaison à O_2
His E7
distale
(D)
His F8
proximale
Fe
Oxygène
moléculaire
His E7
distale
Désoxymyoglobine : le fer s'écarte de 0,4 Å
du plan des pyrroles
Oxymyoglobine : le fer revient
vers le plan des pyrroles

STRUCTURE DES HÉMOGLOBINES ET DES OXYHÉMOGLOBINES

Les hémoglobines des vertébrés sont constituées de quatre sous-unités : deux copies d'une sous-unité de type α, et deux copies d'une sous-unité de type β, la cohésion de l'ensemble étant assurée par des interactions non covalentes. Les chaînes des hémoglobines sont très semblables à celles des myoglobines mais elles sont plus courtes car elles ne possèdent pas les six derniers résidus de ces dernières, comme le montre la *Figure 21.3* pour la chaîne de la myoglobine et la chaîne α de l'hémoglobine humaine.

Les structures tridimensionnelles de nombreuses hémoglobines, dont celles de l'Homme, ont été déterminées par diffraction de rayons X ; il s'est avéré qu'elles étaient très semblables. Comme pour la myoglobine, chaque chaîne adopte le reploiement globinique et possède un hème dont l'atome de fer, lié à une histidine proximale, est placé en regard d'une histidine distale (*Figure 21.4A*) ; chaque chaîne présente donc un site de fixation pour l'oxygène moléculaire. La molécule tétramérique d'hémoglobine (*Figure 21.4B*) est approximativement sphérique, avec un diamètre de 55 Å environ. Sa structure est telle que les hèmes y sont disposés au sommet d'un tétraèdre. Les sous-unités de type différent établissent entre elles de nombreux contacts ; en revanche, les sous-unités de même type n'ont que peu de points de connexion. Ainsi, l'hémoglobine peut être décrite comme une paire de dimères αβ, $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_2$, qui s'associent pour former un tétramère susceptible de fixer réversiblement quatre molécules d'oxygène. L'oxygénation s'accompagne d'une rotation des dimères $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_2$ l'un par rapport à l'autre ; ce mouvement peut être apprécié par la détermination des distances entre les quatre atomes de fer (*Figure 21.4C*).

Figure 21.3

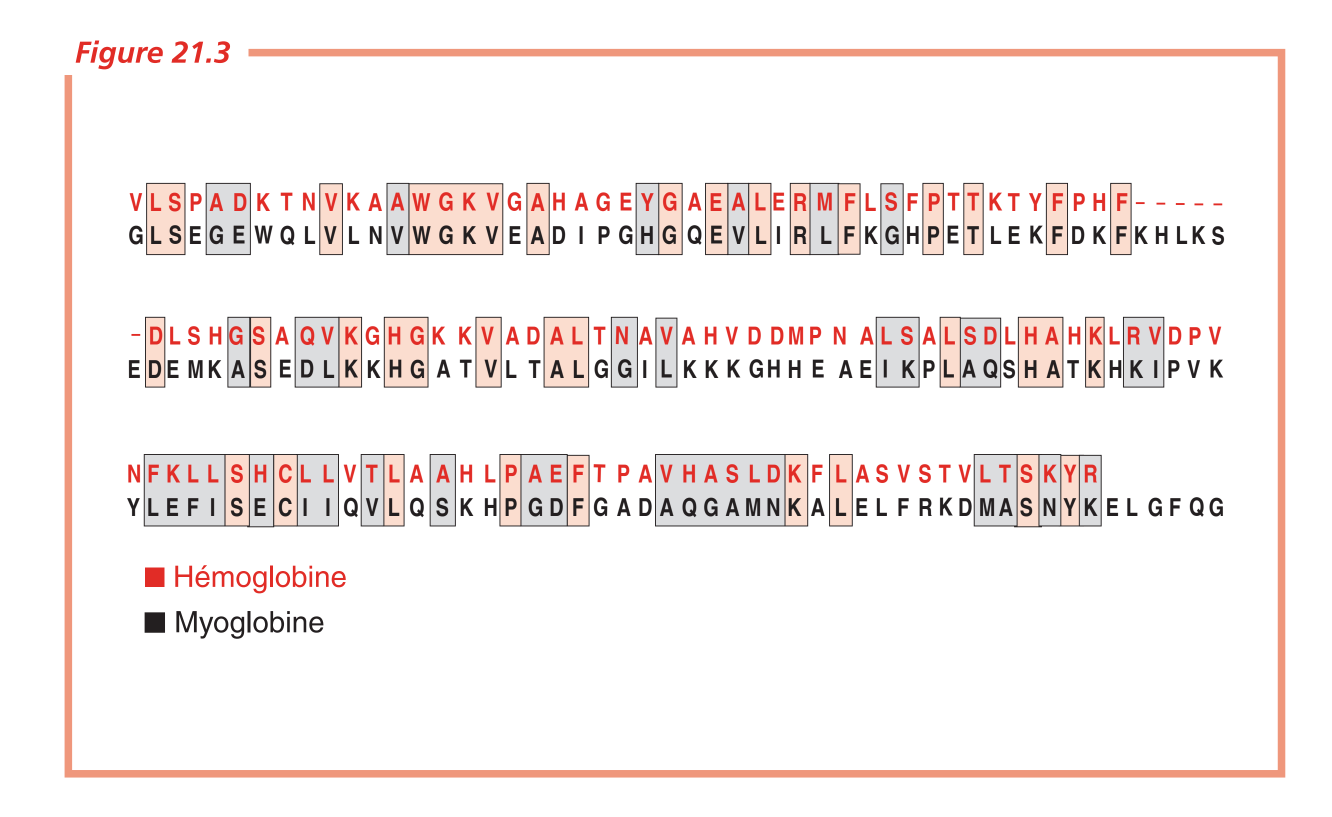




Figure 21.4

(A)
C
F
B
E
G
H
A
α
C
D
F
B
E
G
H
A
β
(B)
β_2
β_1
α_2
α_1
(C)
β_2
33,4
β_1
25,0
35,0
25,0
α_1
36,0
α_2
Oxyhémoglobine
β_2
39,9
β_1
24,7
36,9
24,7
α_1
34,9
α_2
Désoxyhémoglobine

LA FAMILLE DES GÈNES DE GLOBINE

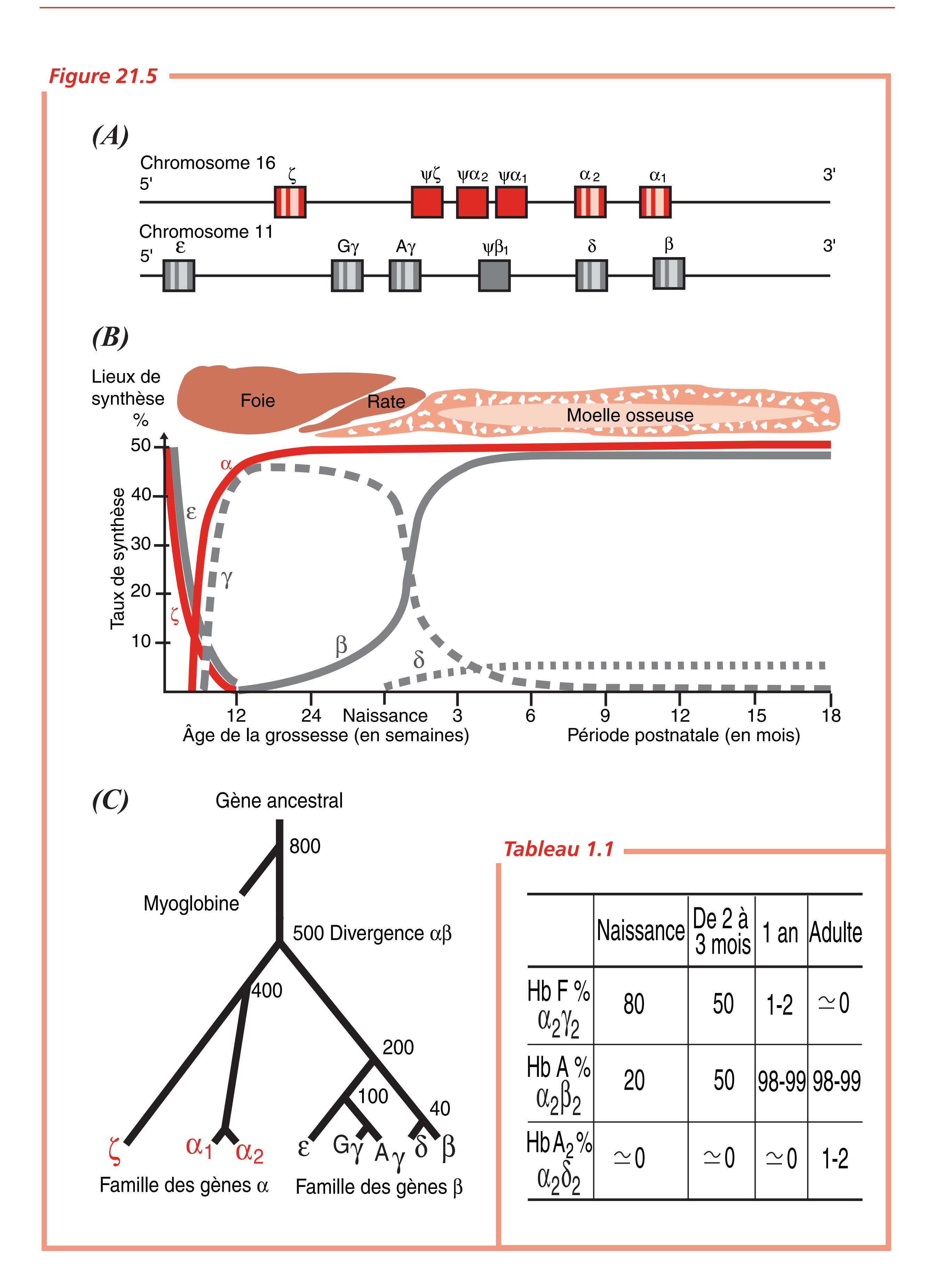
Le génome possède une famille de gènes de globine regroupés en deux complexes : le complexe α et le complexe β. Chez l'Homme *(Figure 21.5A)*, le complexe α est situé sur le bras court du chromosome 16, où il s'étend sur 35 kb ; le complexe β est localisé sur le bras court du chromosome 11, sur une longueur de 60 kb environ. Tous les gènes de globine sont constitués de trois exons séparés par deux introns. Leur expression est régulée au cours de l'ontogenèse, leur ordre d'expression étant identique à leur ordre sur les chromosomes *(Figure 21.5B)*.

Le complexe α comprend un gène ζ qui code la chaîne ζ exprimée durant la période embryonnaire, deux gènes α_2 et α_1, qui ne diffèrent qu'au niveau du deuxième intron, et donc codent la même chaîne α exprimée chez le fœtus et chez l'adulte, puis trois pseudogènes. Les chaînes ζ et α possèdent toutes deux 141 aminoacides. Le complexe β contient le gène ε, exprimé durant la période embryonnaire, Gγ et Aγ, exprimés pendant la vie fœtale et durant les premiers mois de la vie, δ, exprimé après la naissance, β, exprimé dès la douzième semaine de la grossesse, mais essentiellement après la naissance et durant toute la vie adulte, puis enfin un pseudogène. Les gènes Gγ et Aγ codent des chaînes γ qui diffèrent uniquement par leur résidu aminoacide 136, qui est une glycine ou une alanine, respectivement. Les chaînes ε, γ, β et δ possèdent toutes 146 aminoacides.

Ainsi, chez l'Homme, durant les premières semaines de la vie, l'hémoglobine est principalement de type embryonnaire, $\zeta_2\varepsilon_2$. Dès les premières semaines de la grossesse, l'hémoglobine fœtale HbF, $\alpha_2\gamma_2$, apparaît. Après la naissance, la synthèse des chaînes γ diminue au profit de celle des chaînes β et, très accessoirement δ, ce qui conduit à la présence des hémoglobines adultes HbA, $\alpha_2\beta_2$, et HbA2, $\alpha_2\delta_2$ (*Tableau 21.1*). Les différences de structure des hémoglobines se traduisent par des différences de propriétés.

ÉVOLUTION DES GÈNES DE GLOBINE

Les nombreuses similitudes dans les séquences des aminoacides des chaînes polypeptidiques de la myoglobine et des hémoglobines (tableau 00) laissent à penser que les gènes qui les codent dérivent, par duplications successives, d'un gène ancestral *(Figure 21.5C)*. Ce dernier serait apparu il y a quelque 800 millions d'années, puis se serait dupliqué pour donner, après divergence, les ancêtres des chaînes α et β, il y a environ 500 millions d'années, au début de l'évolution des vertébrés. Cette duplication est donc apparue bien avant que les mammifères ne divergent. De plus, dans la plupart des espèces, les gènes α et β ne sont pas restés sur le même chromosome. La duplication la plus récente est celle des chaînes δ.



	Naissance	De 2 à 3 mois	1 an	Adulte
Hb F % $\alpha_2\gamma_2$	80	50	1-2	≃0
Hb A % $\alpha_2\beta_2$	20	50	98-99	98-99
Hb A_2 % $\alpha_2\delta_2$	≃0	≃0	≃0	1-2

FONCTION DES MYOGLOBINES ET DES HÉMOGLOBINES

La fonction des myoglobines et des hémoglobines découle de leur aptitude à fixer, de façon réversible, l'oxygène moléculaire. On étudie cette propriété en mesurant la saturation Y, définie comme la fraction de molécules saturées en oxygène, en fonction de la pression partielle d'oxygène pO_2 *(Figure 21.6A)*. L'affinité pour l'oxygène est caractérisée par la P_{50}, pression partielle d'oxygène pour laquelle 50 % des sites sont occupés, c'est-à-dire pour laquelle $Y = 0{,}5$. Une valeur faible de la P_{50} traduit une forte affinité de la protéine pour l'oxygène ; inversement, une valeur forte signifie une faible affinité de la protéine pour l'oxygène. Les courbes de saturation et les P_{50} de la myoglobine et de l'hémoglobine A humaines sont celles données dans la *Figure 21.6A*.

La fixation de l'oxygène par la myoglobine est représentée par une hyperbole qui traduit une simple association réversible de l'hème et de l'oxygène : $MbO_2 \rightleftharpoons Mb + O_2$

La constante de dissociation Kd et la saturation Y de l'oxymyoglobine sont définies par les relations :

$$Kd = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]} \qquad \text{et} \qquad Y = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2]+[Mb]}$$

où [Mb], $[MbO_2]$ et $[O_2]$ sont les concentrations en moles par litre de la désoxymyoglobine, de l'oxymyoglobine et de l'oxygène, respectivement.

La substitution de la première équation dans la deuxième donne

$$Y = \frac{[O_2]}{[O_2]+Kd} = \frac{pO_2}{pO_2+Kd}$$

qui est l'équation d'une hyperbole correspondant à la courbe expérimentale. À demi-saturation, $Y = 0{,}5$ et Kd correspond à la P_{50}.

La fixation de l'oxygène par l'hémoglobine est représentée par une courbe sigmoïde qui traduit une coopérativité positive homotropique entre les hèmes (p. 31).

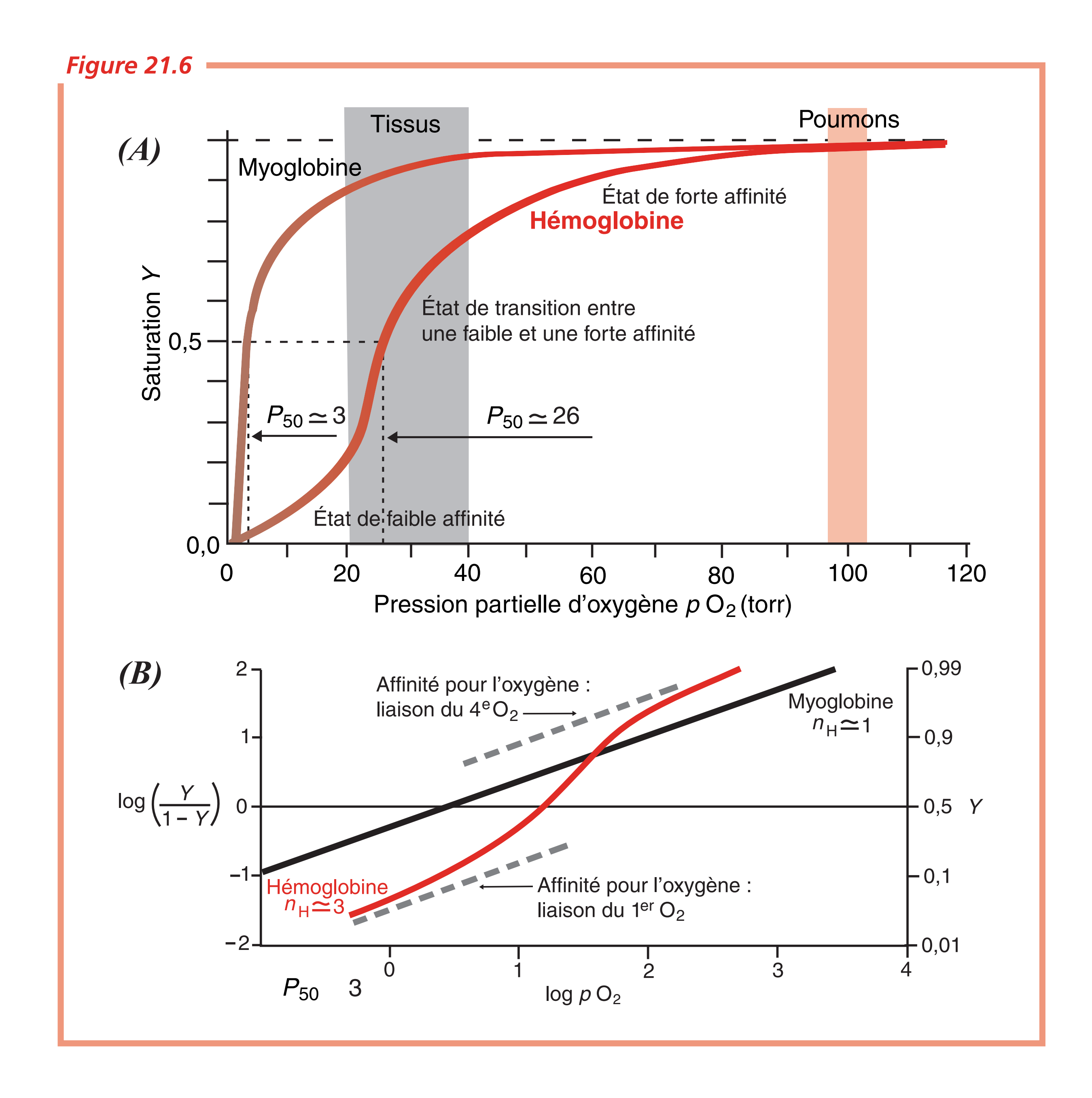
La considération de l'équilibre $Hb(O_2)_n \rightleftharpoons Hb + nO_2$ conduit à la relation :

$$Y = \frac{(pO_2)^n}{(pO_2)^n + (P_{50})}$$

qui peut être transformée pour donner l'expression de la courbe de Hill :

$$\log \frac{Y}{1-Y} = n \log (pO_2) - \log (P_{50})$$

Figure 21.6



La valeur expérimentale de la pente *n* de la courbe de Hill (*Figure 21.6B*) est le coefficient de Hill n_H qui traduit, non pas le nombre de sites de liaison, mais le degré de coopérativité. Plus n_H est élevé, plus forte est la coopérativité. Pour la myoglobine, il a la valeur 1 et, pour l'hémoglobine, une valeur d'environ 3 qui traduit le fait que la liaison entre une molécule d'oxygène et un hème facilite la liaison d'une seconde molécule d'oxygène à un autre hème du même tétramère, et ainsi de suite, jusqu'à saturation complète des quatre sites. Inversement, le départ de l'oxygène d'un hème accélère la libération des molécules d'oxygène des sites encore saturés. Ainsi, une hémoglobine dont les sites présentent une coopérativité positive suit de plus près les variations des pO_2 tissulaires que ne le ferait une hémoglobine dont les sites seraient indépendants. En effet, elle libère davantage d'oxygène et donc l'oxygénation des tissus est plus complète.

L'HÉMOGLOBINE F A PLUS D'AFFINITÉ POUR L'OXYGÈNE QUE L'HÉMOGLOBINE A

L'hémoglobine fœtale F, de constitution sous-unitaire $\alpha_2\gamma_2$, a une plus grande affinité pour l'oxygène que l'hémoglobine adulte A, de constitution sous-unitaire $\alpha_2\beta_2$ (*Figure 21.7A*). Ainsi, le transfert placentaire d'oxygène se trouve orienté dans un sens favorable à l'oxygénation des tissus du fœtus.

LES IONS H^+ ET LE CO_2 FAVORISENT LA LIBÉRATION DE L'OXYGÈNE

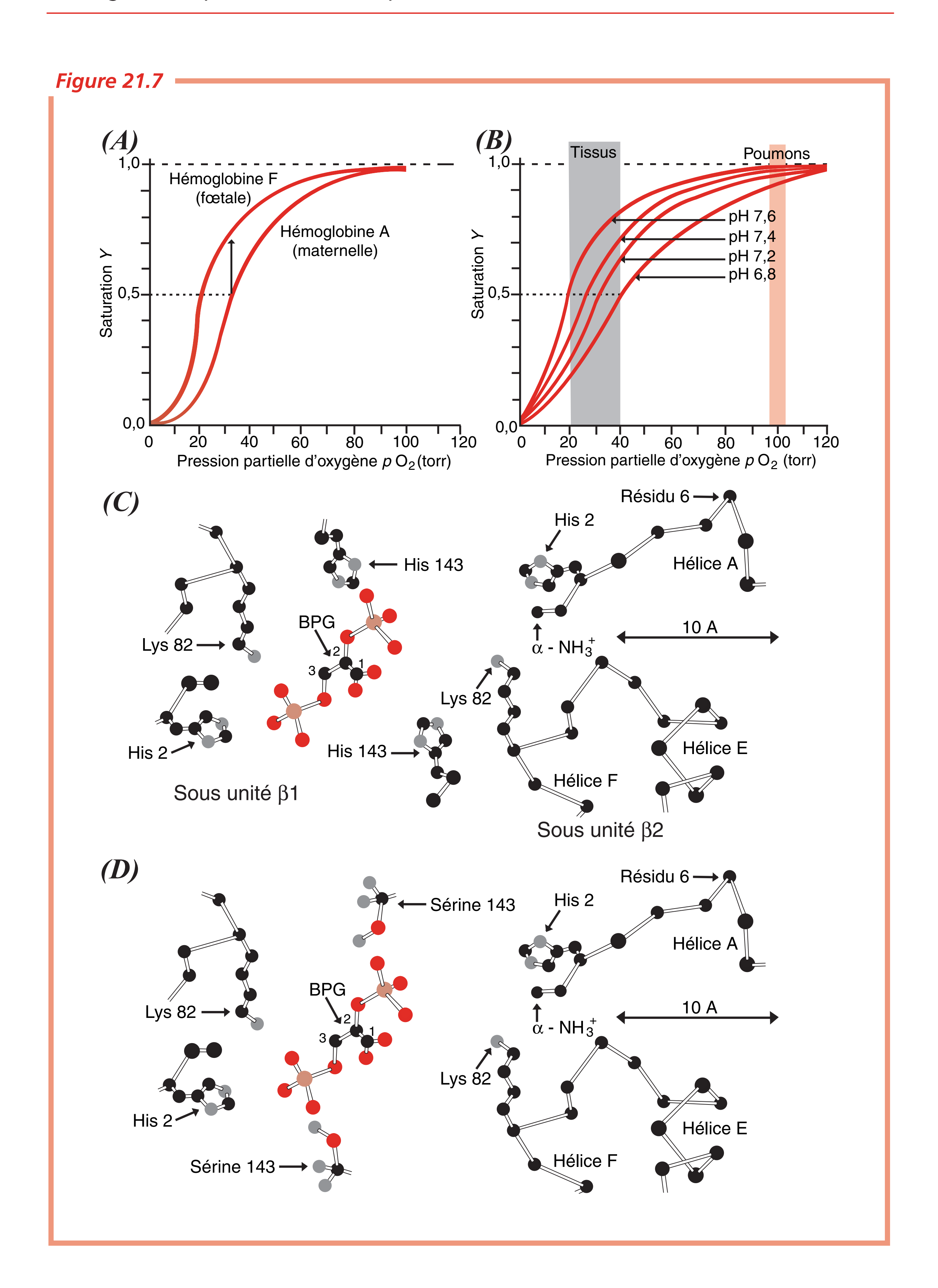
L'abaissement du pH diminue l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (*Figure 21.7B*). Il en va de même avec l'augmentation de la concentration du CO_2 à pH constant. C'est l'effet Bohr. Ainsi, l'oxyhémoglobine libère plus rapidement son oxygène dans les tissus lorsqu'un métabolisme intense ou un phénomène pathologiqque abaissent le pH ou augmentent la concentration du CO_2. Par ailleurs, en présence de fortes pressions partielles d'oxygène dans les alvéoles pulmonaires, l'hémoglobine libère H^+ et CO_2. C'est l'effet Haldane.

LE 2,3-BISPHOSPHOGLYCÉRATE DIMINUE L'AFFINITÉ DE L'HÉMOGLOBINE POUR L'OXYGÈNE

L'affinité de l'hémoglobine A et F pour l'oxygène est plus faible dans les globules rouges qu'elle ne l'est en solution. Cet effet est dû à un phosphate organique, le 2,3-bisphosphoglycérate (2,3-BPG), qui diminue l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène en se liant à la désoxyhémoglobine mais pas à l'oxyhémoglobine, ce qui est en faveur de l'oxygénation des tissus. En l'absence de 2,3-BPG, l'hémoglobine est un transporteur peu efficace qui ne libère que 8% de son oxygène.

L'étude de la structure tridimensionnelle du tétramère de désoxyhémoglobine A y a révélé la présence d'une cavité centrale où peut se fixer le 2,3-BPG (*Figure 21.7C*). Ce dernier, très anionique, y entre en interaction avec trois résidus chargés positivement de chaque chaîne β, l'histidine 2, la lysine 62 et l'histidine 143, stabilisant ainsi la désoxyhémoglobine et réduisant donc son affinité pour l'oxygène. Dans le tétramère d'oxyhémoglobine, la cavité se contracte et le 2,3-BPG est expulsé lors de la fixation de l'oxygène. Dans la cavité de la désoxyhémoglobine F (*Figure 21.7D*), il n'y a que deux résidus chargés positivement ; en effet, dans la chaîne γ de l'hémoglobine F, l'histidine 143 présente dans la chaîne β de l'hémoglobine A est substituée par une sérine et il y a deux charges positives de moins. La liaison entre le 2,3-BPG et l'hémoglobine F est donc moins forte que la liaison entre le 2,3-BPG et l'hémoglobine A et l'affinité pour l'oxygène de l'hémoglobine F est donc plus grande que celle de l'hémoglobine A.

Figure 21.7


(A)
1,0
0,5
0,0
Saturation Y
Hémoglobine F
(fœtale)
Hémoglobine A
(maternelle)
0
20
40
60
80
100
120
Pression partielle d'oxygène p O2 (torr)
(B)
Tissus
Poumons
pH 7,6
pH 7,4
pH 7,2
pH 6,8
(C)
Résidu 6
His 2
His 143
Hélice A
BPG
Lys 82
α - NH3+
10 A
Lys 82
His 2
His 143
Hélice E
Hélice F
Sous unité β1
Sous unité β2
(D)
Sérine 143
Sérine 143

DRÉPANOCYTOSE ET HÉMOGLOBINE S

Au début du XXe siècle, James Herrick a été le premier à observer un grand nombre de globules rouges en forme de faucille, chez un patient de race noire souffrant d'une anémie chronique sévère ; il a alors émis l'hypothèse que cette anomalie était à l'origine de la maladie. Par la suite, il s'est avéré qu'une telle anémie, dénommée drépanocytose, ou parfois anémie falciforme, était fréquente chez les sujets de race noire.

La falciformation des globules rouges et la transmission héréditaire de la maladie suggéraient qu'il s'agissait d'une anomalie génétique de l'hémoglobine. Effectivement, dans les années 1950, par des méthodes électrophorétiques, Linus Pauling a découvert que les globules rouges falciformes possèdent soit deux hémoglobines, l'hémoglobine A et une autre hémoglobine de point isoélectrique plus élevé, donc plus basique, soit uniquement cette dernière, ces deux schémas correspondant aux hétérozygotes ou aux homozygotes, respectivement. Pauling a dénommé cette nouvelle hémoglobine hémoglobine S et a créé le terme maladie moléculaire pour caractériser la drépanocytose. Quelques années plus tard, en utilisant la méthode des empreintes digitales, Vernon Ingram a montré que l'hémoglobine S est semblable à l'hémoglobine A, mais que ses chaînes β présentent une valine à la place d'un glutamate, au niveau de la position 6, et qu'elle correspondait donc à $\alpha_2\ \beta^s{}_2$ (*Figure 21.8A*). Il a été établi depuis que ce changement est dû à une simple mutation au niveau du sixième codon du premier exon du gène de la β globine, où GTG remplace GAG. C'était la première démonstration qu'un changement allélique au niveau d'un seul gène pouvait conduire à une maladie moléculaire.

LA DÉSOXYHÉMOGLOBINE S EST TRÈS PEU SOLUBLE

L'étude comparative de l'hémoglobine A et de l'hémoglobine S montre que ni l'affinité pour l'oxygène, ni les propriétés allostériques de cette dernière ne sont modifiées. De même, la solubilité de l'oxyhémoglobine S est inchangée ; en revanche, celle de la désoxyhémoglobine S est considérablement réduite. La substitution de la valine, résidu aminoacide apolaire hydrophobe, au glutamate, résidu aminoacide polaire ionisable hydrophile, fait apparaître une bosse hydrophobe à la surface de la protéine. Cette dernière peut s'accoler à une aire hydrophobe d'une autre molécule d'hémoglobine S, formée par les résidus phénylalanine b85 et leucine b88, qui ne sont extériorisés que dans la forme désoxy (*Figure 21.8B)*. Dans les capillaires, où l'oxyhémoglobine délivre son oxygène et se transforme donc en désoxyhémoglobine, les interactions hydrophobes peuvent s'exercer. Il a été démontré par microscopie électronique que des fibres très insolubles se forment dans les hématies qui prennent la forme de faucilles, perdent leur souplesse, obturent les capillaires et créent des thromboses. Ce phénomène est très accentué chez les homozygotes dont l'espérance de vie ne dépasse pas une trentaine d'années ; chez les hétérozygotes, il intervient à un degré moindre et peut même être un avantage, comme il va être montré maintenant.

Figure 21.8

(A)

Val
His
Leu
Hb A chaîne β
Extrémité
N-terminale
Thr
Pro
Glu (6)

Extrémité
N-terminale
Val
Hb S chaîne β
Leu
His
Thr
Val (6)

(B)

Oxyhémoglobine S
O_2
Désoxyhémoglobine S

Hématie oxygénée normale
O_2

Phé 85
β
Leu 88
Val
β

α β V α β V β α α β V β α α β V β α β V β α α β V β α α β V β α

Fibre

Polymère de
désoxyhémoglobine S

Hématie falciforme

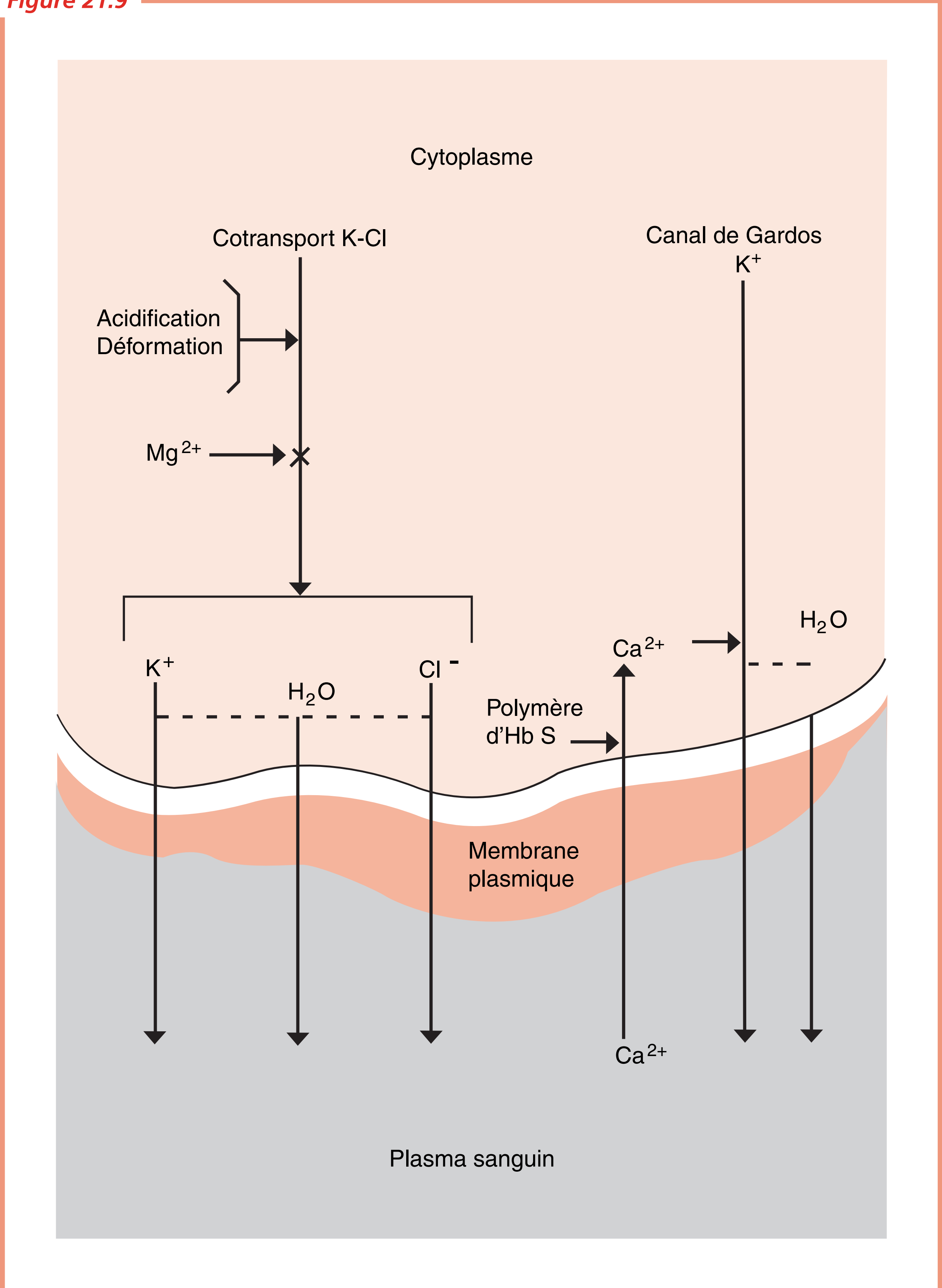
L'HÉMOGLOBINE S CONFÈRE UNE RÉSISTANCE AU PALUDISME

Il est apparu que la drépanocytose confère une résistance accrue au paludisme. Le *Plasmodium*, parasite à l'origine de cette grave maladie, passe une partie de son cycle vital dans les hématies de son hôte. Il y abaisse quelque peu le pH, ce qui à pour effet de favoriser la falciformation, de provoquer une altération de la membrane et de déclencher une fuite du potassium érythrocytaire *(Figure 21.9)*, ce qui conduit à terme à la destruction des cellules infectées et à la mort du parasite. Chez les hétérozygotes, la drépanocytose a accru la survie des patients atteints de paludisme, essentiellement en Afrique. C'est là un exemple de polymorphisme équilibré : un allèle létal chez les homozygotes persiste parce qu'il présente un avantage qui peut être décisif pour les hétérozygotes.

PATHOLOGIE DES GÈNES DE L'HÉMOGLOBINE

Tous les mécanismes de pathologie génique sont retrouvés au niveau des gènes de l'hémoglobine qui ont été les modèles privilégiés des biologistes moléculaires. Le plus fréquemment, ils résultent de mutations, plus rarement de délétions. D'un point de vue physiopathologique, on distingue deux types de mutations. Les mutations siégeant dans une région exonique traduite sont responsables de la biosynthèse d'hémoglobines anormales et donc, d'hémoglobinopathies, telles que la drépanocytose. À ce jour, plus de 500 variantes structurales de l'hémoglobine ont été décrites. Les mutations qui affectent, non pas la structure des globines, mais la synthèse d'une ou de plusieurs chaînes de l'hémoglobine majeure de l'adulte, sont à l'origine des α-thalassémies ou des β-thalassémies, selon que la chaîne concernée est de type α ou de type β.

Figure 21.9


Cytoplasme
Cotransport K-Cl
Canal de Gardos
K^+
Acidification
Déformation
Mg^{2+}
H_2O
Ca^{2+}
K^+
H_2O
Cl^-
Polymère
d'Hb S
Membrane
plasmique
Ca^{2+}
Plasma sanguin

Chapitre 22

Système immunitaire

Les êtres vivants envahis par certaines molécules, par des particules plus ou moins complexes ou par d'autres êtres vivants, tels que des Virus, des Bactéries ou des Parasites, ont des réactions très différentes selon la nature de l'intrus et le niveau d'évolution auquel ils sont parvenus. D'après le modèle endosymbiotique, la cellule eucaryote serait une chimère résultant des fusions successives de trois ou même quatre génomes différents, ceux du noyau-cytoplasme, des flagelles, des mitochondries et des chloroplastes. Chez les êtres vivants actuels, dans de rares circonstances, il y a tolérance ou même symbiose. Ainsi, du DNA étranger peut s'intégrer dans des génomes bactériens et s'y exprimer, une Algue et un Champignon peuvent entrer en symbiose pour constituer un Lichen, la Bactérie *Rhizobium* peut former des nodosités symbiotiques fixatrices d'azote dans les racines des Légumineuses. Cependant, un rejet du non soi maintenant l'intégrité et la personnalité de l'individu est la règle dans le règne animal, règle d'autant plus absolue que le niveau d'évolution est plus élevé. Ce rejet peut être assuré par les mécanismes de l'immunité innée (ou naturelle) et/ou de l'immunité adaptative (ou acquise).

Il y a environ 1 milliard d'années, des cellules phagocytaires devaient représenter les premières versions des défenses des organismes primitifs. Au cours de l'Évolution, ces dernières ont dû nécessairement se perfectionner. Chez les Invertébrés, il est apparu un système immunitaire inné ; ainsi, chez les Insectes, les défenses innées sont assurées par des cellules dénommées hémocytes qui phagocytent les intrus et par des protéines antimicrobiennes. Chez les Vertébrés, le système immunitaire inné s'est maintenu mais un système adaptatif s'y est développé avec l'apparition des lymphocytes. Le système immunitaire inné, avec ses polynucléaires, ses monocytes, ses macrophages, ses cellules NK et ses cellules dendritiques issus des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, y assure la première ligne de défense mais il y assume aussi l'activation du système immunitaire adaptatif ; ainsi, les cellules dendritiques phagocytent l'intrus puis exposent à leur surface des fragments de molécules issues de ce dernier afin d'être susceptibles d'informer les lymphocytes sur sa nature. Les lymphocytes auxiliaires T_H, puis les lymphocytes cytotoxiques T_C, et les lymphocytes B, après avoir reçu au niveau d'un récepteur de leur membrane plasmique un signal spécifique les renseignant sur le profil de la cible à atteindre, réagissent alors de la façon la plus appropriée pour éliminer ce qui est étranger à l'individu et qui donc, potentiellement, le menace.

Le présent chapitre est essentiellement consacré à la présentation des agents moléculaires qui assurent une immunité innée et, éventuellement, une immunité adaptative en participant à la reconnaissance de l'intrus puis à l'activation, la régulation et la coordination des mécanismes de destruction et d'élimination de ce dernier.

VUE D'ENSEMBLE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

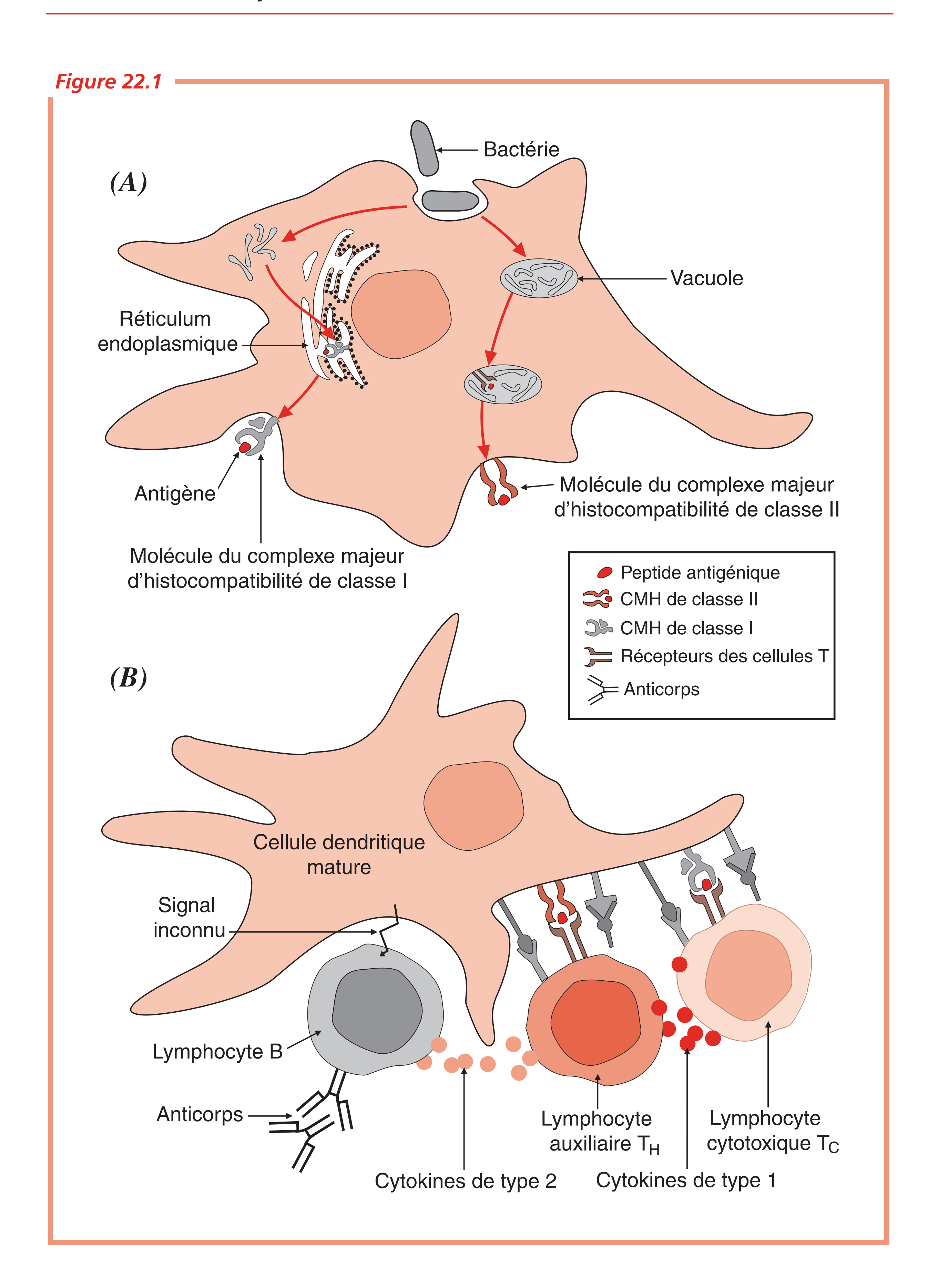
Les cellules qui jouent un rôle fondamental dans le couplage des réponses immunitaires innées et des réponses immunitaires adaptatives sont les cellules dendritiques. Ces dernières repèrent tout intrus, Virus, Bactérie ou Parasite, qui pénètre dans l'organisme à la faveur d'une brèche dans le système de défense naturel de la peau ou des muqueuses, puis elles le signalent aux lymphocytes qu'elles éduquent à distinguer ce qui est étranger à l'organisme. Pour assumer leurs fonctions, les cellules du système immunitaire font appel à des protéines qui, pour l'essentiel, sont toutes construites à partir de domaines présentant un reploiement immunoglobulinique ; ces protéines sont regroupées, avec d'autres, dans la superfamille des immunoglobulines.

Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques constituent une catégorie de globules blancs pourvus de longs prolongements cytoplasmiques nommés dendrites *(Figure 22.1A)*. Elles sont dispersées dans tout l'organisme ; elles représentent environ deux pour mille des globules blancs du sang et sont en proportion encore moindres dans les tissus. Elles font partie de la première ligne de défense des organismes supérieurs, leur fonction essentielle étant d'ingérer l'intrus, de le fragmenter en antigènes et de présenter ces derniers aux lymphocytes ; elles jouent donc un rôle majeur dans l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Il existe deux catégories principales de cellules dendritiques, myéloïdes (DC1) et plasmacytoïdes (DC2), qui se développent à partir de progéniteurs hématopoïétiques déjà engagés dans les lignées myéloïde ou lymphoïde, respectivement. Les cellules dendritiques myéloïdes joueraient le rôle d'interface entre le système de l'immunité innée et celui de l'immunité adaptative, tandis que les cellules dendritiques plasmacytoïdes seraient essentiellement impliquées dans le système immunitaire adaptatif.

Sous forme encore immature, ces deux catégories de cellules dendritiques circulent dans le sang puis se sédentarisent dans la peau, les muqueuses ou certains organes tels que la rate et les poumons. C'est sous cette forme qu'elles captent par endocytose ou pinocytose l'intrus qui est ensuite fragmenté. Après capture des Virus, les cellules dendritiques plasmacytoïdes sécrètent une cytokine, l'interféron α ; ces cellules agiraient en amont de l'ensemble des cellules du système immunitaire car l'interféron α stimule toutes les autres cellules dendritiques.

Les fragments antigéniques apparaissent à la surface des cellules dendritiques devenues matures, associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II (p. 420). Ils peuvent alors être présentés aux lymphocytes *(Figure 22.1B)*.


Figure 22.1
(A)
Bactérie
Vacuole
Réticulum endoplasmique
Antigène
Molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
Molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
Peptide antigénique
CMH de classe II
CMH de classe I
Récepteurs des cellules T
Anticorps
(B)
Cellule dendritique mature
Signal inconnu
Lymphocyte B
Anticorps
Lymphocyte auxiliaire T_H
Lymphocyte cytotoxique T_C
Cytokines de type 2
Cytokines de type 1

Lymphocytes T et lymphocytes B

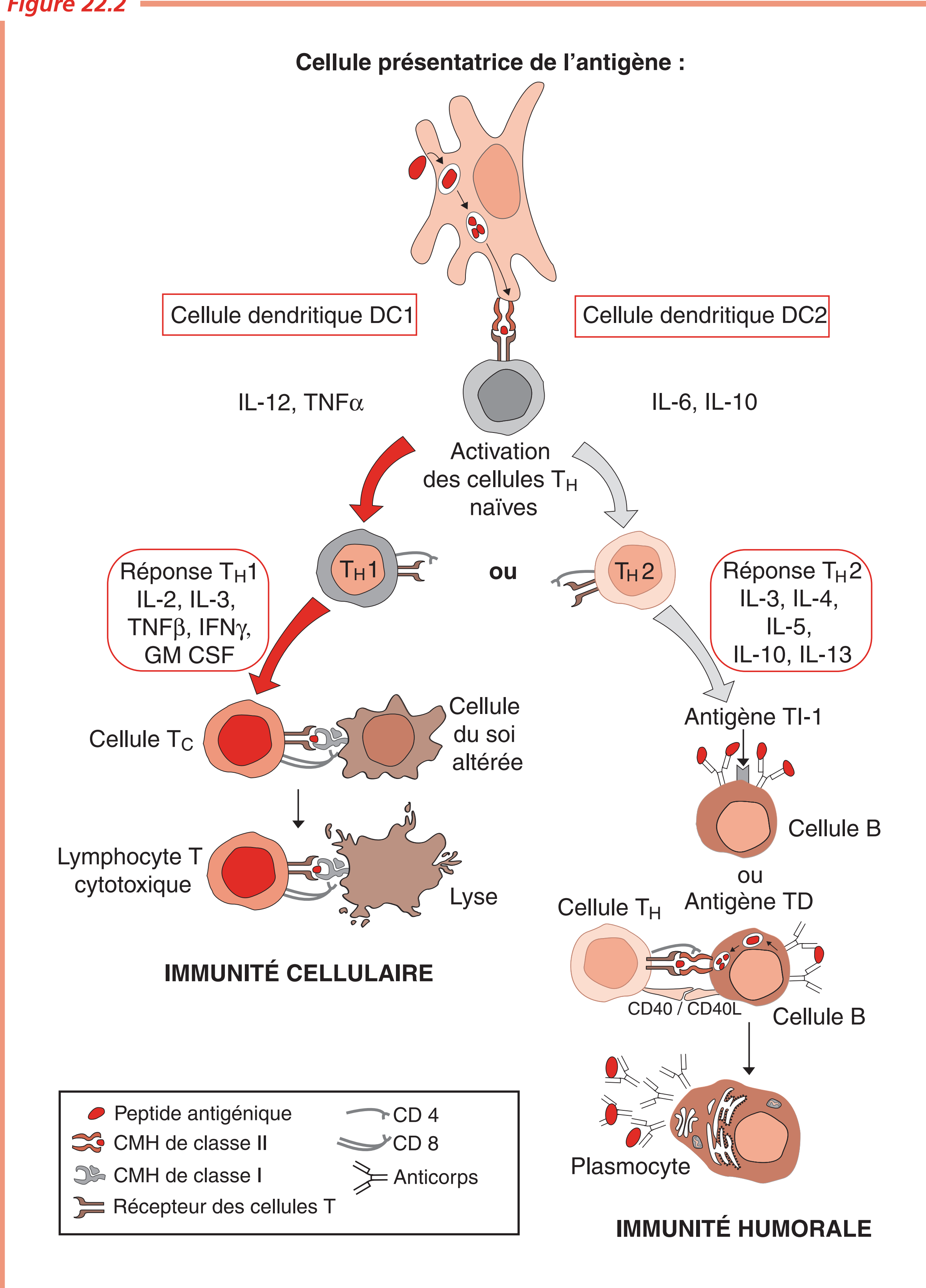
Les cellules dendritiques apprennent à des lymphocytes T auxiliaires qui n'ont encore jamais rencontré d'antigènes, les T_H naïfs, à reconnaître un antigène comme étranger. Pour ce faire, elles présentent à ces lymphocytes les antigènes fixés sur des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II *(Figure 22.2)*. Cette présentation s'effectue à la suite de la formation d'une synapse immunologique où les deux cellules entrent en contact par l'intermédiaire de certaines molécules de leur surface. Les protéines du CMH de classe II des cellules dendritiques, chargées d'un antigène, se fixent sur le récepteur des lymphocytes T_H naïfs ; de plus, des molécules telles que CD54, CD58 et CD80 participent au rapprochement et au contact des cellules dendritiques et des T_H naïfs *(Figure 22.1B)*. Les cellules dendritiques DC1 sécrètent les cytokines IL-12 et TNF-α, qui conduisent à une réponse T_H1, tandis que les cellules dendritiques DC2 sécrètent les cytokines IL--6 et IL-10 qui conduisent à une réponse T_H2.

Une fois éduqués, les T_H, qui représentent alors la deuxième ligne de défense des organismes supérieurs, produisent des cytokines directement à l'origine d'une réponse T_H. Les cytokines IL-2, IFN-γ, TNF-β, GM-CSF et IL-3 déclenchent une réponse de type T_H1 responsable d'une immunité à médiation cellulaire telle qu'une activation des lymphocytes cytotoxiques T_C, une réaction d'hypersensibilité retardée ou la production d'anticorps IgG opsonisants. Les cytokines IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 déclenchent une réponse de type $T_H 2$ responsable d'une immunité humorale telle qu'une activation des lymphocytes B avec production de certaines immunoglobulines telles que les isotypes d'IgG non opsonisants, les IgM ou les IgE. Dans le premier cas, des lymphocytes T_C détruisent les cellules infectées par contact ; dans le second, des anticorps se lient aux antigènes et les inactivent.

De plus, les cellules dendritiques influent directement sur les lymphocytes B, mais on ignore encore la nature du signal ; elles stimulent aussi directement des lymphocytes T_C par le biais de synapses immunologiques semblables à celles contractées avec les lymphocytes T_H naïfs mais alors ce sont des protéines du CMH de classe I qui interviennent dans la présentation de l'antigène.

Ainsi, la réponse immunitaire à un agent pathogène particulier induit les réponses immunitaires appropriées susceptibles d'éliminer l'agent lui-même ou les produits toxiques que ce dernier peut sécréter. La réaction de l'organisme, cellulaire avec l'activation et la prolifération et de lymphocytes T_C ou humorale avec la production d'anticorps par les lymphocytes B, dépend du type des cellules dendritiques qui donnent le signal, du type des protéines du CMH qui présentent l'antigène et du type des cytokines sécrétées par les lymphocytes T_H.

Figure 22.2


Cellule présentatrice de l'antigène :
Cellule dendritique DC1
Cellule dendritique DC2
IL-12, TNFα
IL-6, IL-10
Activation des cellules T_H naïves
T_H1
ou
T_H2
Réponse T_H1 IL-2, IL-3, TNFβ, IFNγ, GM CSF
Réponse T_H2 IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13
Cellule T_C
Cellule du soi altérée
Lymphocyte T cytotoxique
Lyse
IMMUNITÉ CELLULAIRE
Antigène TI-1
Cellule B
ou
Antigène TD
Cellule T_H
CD40 / CD40L
Cellule B
Plasmocyte
IMMUNITÉ HUMORALE
Peptide antigénique
CMH de classe II
CMH de classe I
Récepteur des cellules T
CD 4
CD 8
Anticorps

Protéines du système immunitaire et superfamille des immunoglobulines

Nombre de protéines appartiennent à une superfamille dite des immunoglobulines. Elles possèdent toutes un ou plusieurs domaines qui résultent de l'expression de gènes ayant évolué à partir d'un gène ancestral commun par duplication et divergence. De tels domaines *(Figure 22.3A)* sont, au moins dans leur expression la plus simple, constitués de sept brins β organisés, à la suite d'un reploiement dit immunoglobulinique, en deux feuillets plissés antiparallèles, l'un de quatre brins, l'autre de trois brins ; ces derniers sont étroitement accolés et unis par des interactions hydrophobes entre résidus conservés ainsi que par une liaison disulfure. Les boucles qui relient les brins sont de longueur variable.

Sont membres de cette superfamille, entre autres, les protéines qui interviennent dans les réponses immunitaires *(Figure 22.3B),* telles que les protéines du CMH de classe I ou de classe II et la β_2-microglobuline, le récepteur des lymphocytes T et les chaînes γ, δ et ε du CD3, les protéines accessoires CD4 et CD8 des lymphocytes T, l'hétérodimère Ig-α/Ig-β constituant du récepteur des lymphocytes B, les immunoglobulines et certaines molécules d'adhésion cellulaire, parmi lesquelles figurent VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, LFA-3.

Figure 22.3

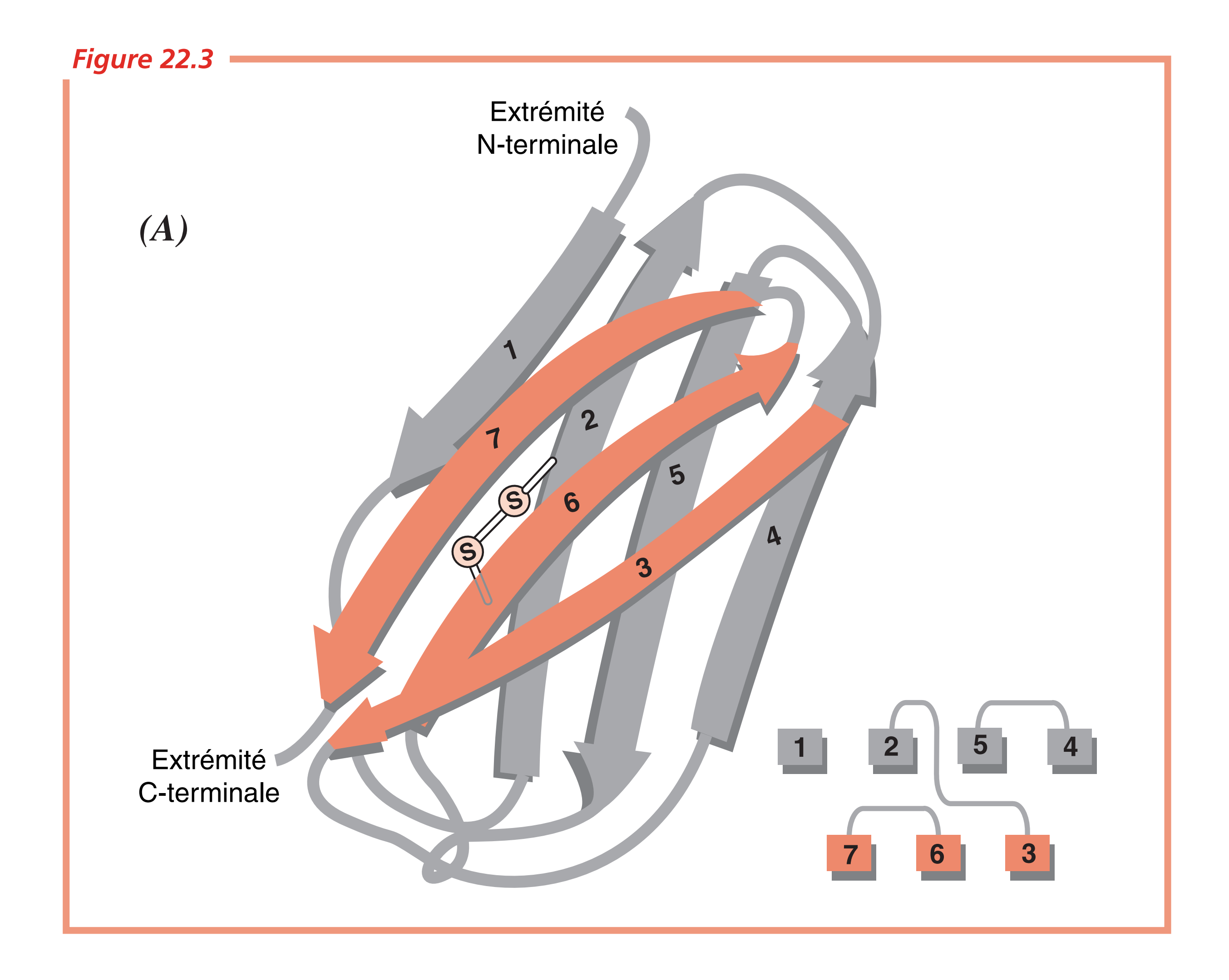
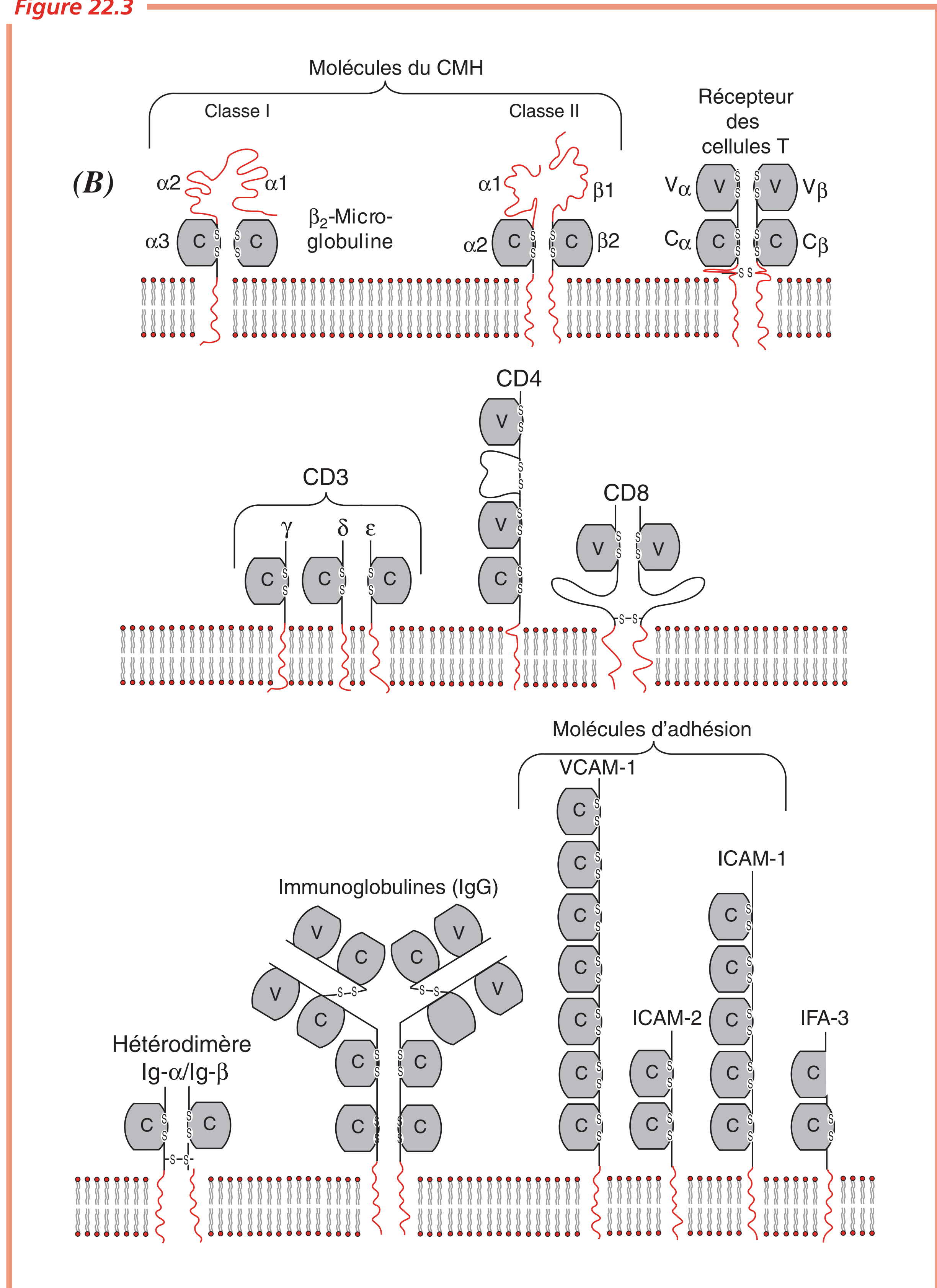


Figure 22.3


Molécules du CMH
Classe I
Classe II
(B)
α2
α1
α3
C
C
β2-Micro-globuline
α1
β1
α2
β2
Récepteur des cellules T
Vα
Vβ
Cα
Cβ
CD4
CD3
γ
δ
ε
CD8
Molécules d'adhésion
VCAM-1
ICAM-1
Immunoglobulines (IgG)
ICAM-2
IFA-3
Hétérodimère Ig-α/Ig-β

PROTÉINES DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITÉ ET PRÉSENTATION DES ANTIGÈNES CELLULAIRES

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est un groupe d'environ soixante-quinze gènes codant pour des protéines impliquées dans les réponses immunitaires et, en particulier, dans la présentation des antigènes aux lymphocytes. Ces protéines sont regroupées dans plusieurs classes.

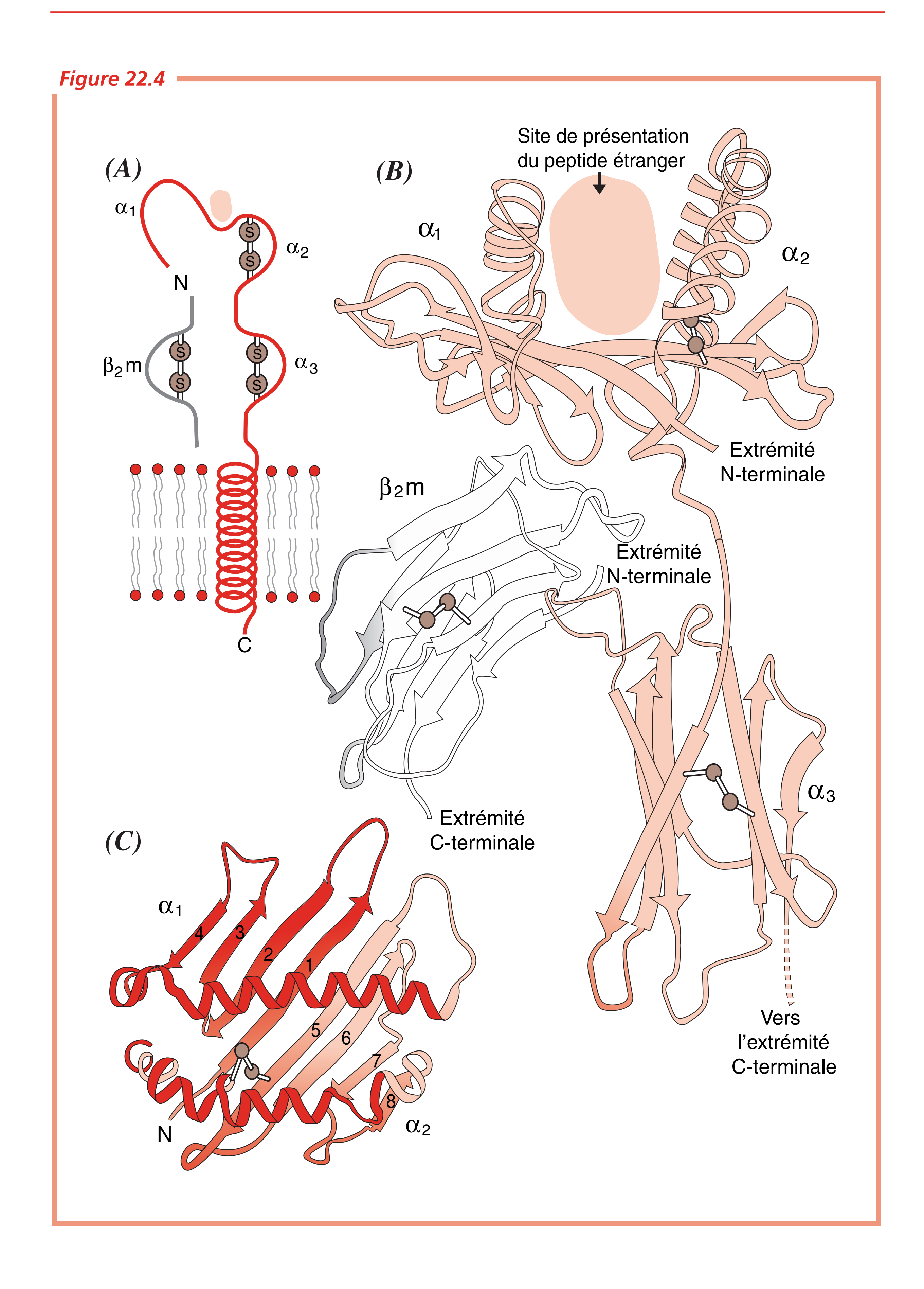
Les protéines du CMH de classe I sont exprimées dans toutes les cellules nucléées de l'organisme, y compris les cellules présentatrices de l'antigène, tandis que celles de classe II ne le sont que dans ces dernières. Les protéines du CMH de classe I et de classe II sont des protéines intégrales sous-unitaires constituées de domaines ; l'extrémité N-terminale des chaînes qui les constituent adopte une conformation où interviennent des feuillets plissés β et des hélices α qui définissent un site de présentation de l'antigène. Elles diffèrent par leur structure, la nature et la taille des fragments antigéniques qu'elles prennent en charge et le type de lymphocytes qu'elles activent ; elles jouent donc un rôle essentiel dans la reconnaissance des antigènes par ces derniers.

Protéines du CMH de classe I

Les protéines du CMH de classe I *(Figure 22.4A)* sont des protéines intégrales exprimées par toutes les cellules nucléés et les plaquettes. Elles sont constituées d'une chaîne α d'environ 390 résidus aminoacide (44 kDa) et d'une chaîne β de 99 résidus aminoacide (12 kDa) dénommée β_2-microglobuline ; il n'y a pas de liaison covalente entre les deux chaînes. La chaîne α présente trois domaines extracellulaires, α_1, α_2 et α_3, d'environ 90 résidus aminoacide, un domaine transmembranaire et une queue cytosolique.

La structure tridimensionnelle d'HLA-A2 (de *human lymphocyte antigen A2*), l'une des protéines du CMH de classe I, a été la première à être déterminée *(Figure 22.4B)*. Le domaine α_3 a une séquence et une structure très semblables à celles des domaines constants des immunoglobulines (p. 428), mais les domaines α_1 et α_2 ont des structures très différentes. La structure de β_{2}-microglobuline est de type immunoglobulinique. Une protéine du CMH de classe I est donc formée de deux régions globulaires. L'une d'elles, constituée de deux domaines relativement constants de type immunoglobulinique, le domaine α_3 et la β_2-microglobuline, est proche de la surface cellulaire à laquelle elle est attachée par le domaine transmembranaire. Le domaine α_3 possède un site de liaison pour le CD8 (p. 428). L'autre région, composée des domaines α_1 et α_2, contient le site de liaison et de présentation de l'antigène *(Figure 22.4B)* ; chaque domaine étant constitué d'un feuillet plissé de quatre brins β et d'une hélice α, l'association des deux domaines donne une cavité de 18 Å de large *(Figure 22.4C)* dont les huit brins β forment le plancher et les deux hélices α les parois latérales. Cette cavité est au contact du milieu extracellulaire et les résidus aminoacide qui la tapissent sont très variables dans les diverses protéines qui constituent la classe I ; de telles caractéristiques structurales permettent donc la fixation d'antigènes très différents.

Figure 22.4


(A)
α1
α2
N
β2m
S
α3
C
(B)
Site de présentation
du peptide étranger
α1
α2
Extrémité
N-terminale
β2m
Extrémité
N-terminale
Extrémité
C-terminale
α3
Vers
l'extrémité
C-terminale
(C)
α1
4
3
2
1
5
6
7
8
N
α2

Protéines du CMH de classe II

Les protéines du CMH de classe II *(Figure 22.5A)* sont des protéines intégrales exprimées par les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques et certains lymphocytes. Ce sont des hétérodimères constitués d'une chaîne α de 33 kDa et d'une chaîne β de 28 kDa associées de façon non covalente. Chaque chaîne α présente deux domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire et une queue C-terminale cytosolique. Les domaines N-terminaux α_1 et β_1 sont les plus variables de la molécule et forment le site de liaison au peptide. Un site de liaison au CD4 est présent sur le domaine β2.

La structure tridimensionnelle des protéines du CMH de classe II a été elle aussi déterminée *(Figure 22.5B)* et a montré une grande similitude avec celle des protéines du CMH de classe I, en particulier au niveau de la cavité de fixation des antigènes ; cependant, des différences de structure permettent aux protéines du CMH de classe II de fixer des antigènes autres que ceux fixés par les protéines du CMH de classe I.

La présentation d'un antigène par une molécule du CMH de classe I ou par une molécule du CMH de classe II est fonction de la voie mise en œuvre par une cellule pour dégrader et fragmenter ce dernier. Ainsi, un antigène endogène *(Figure 22.6A)*, tel qu'une protéine virale synthétisée au sein d'une cellule infectée par un Virus ou une protéine anormale synthétisée par une cellule cancéreuse, est dégradé en fragments peptidiques qui se complexent à des protéines du CMH de classe I au sein du réticulum endoplasmique. Les complexes ainsi formés sont dirigés vers la membrane plasmique où ils sont présentés aux lymphocytes T_C $CD8^+$.

Les antigènes exogènes *(Figure 22.6B)* sont ingérés par endocytose ou phagocytose par les cellules présentatrices de l'antigène puis dégradés en courts fragments peptidiques qui sont alors complexés à des protéines du CMH de classe II pour être dirigés vers la membrane plasmique où ils sont présentés aux lymphocytes T_H $CD4^+$.

Figure 22.5

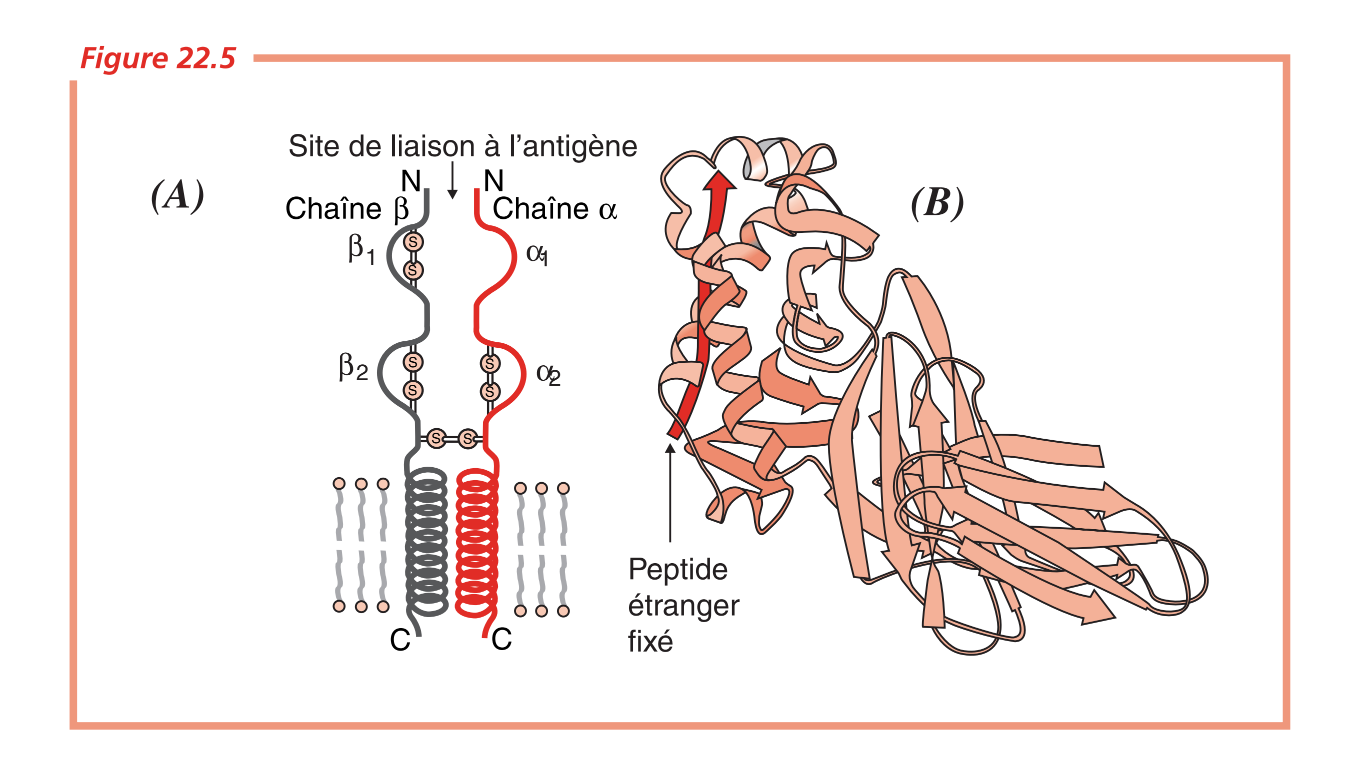
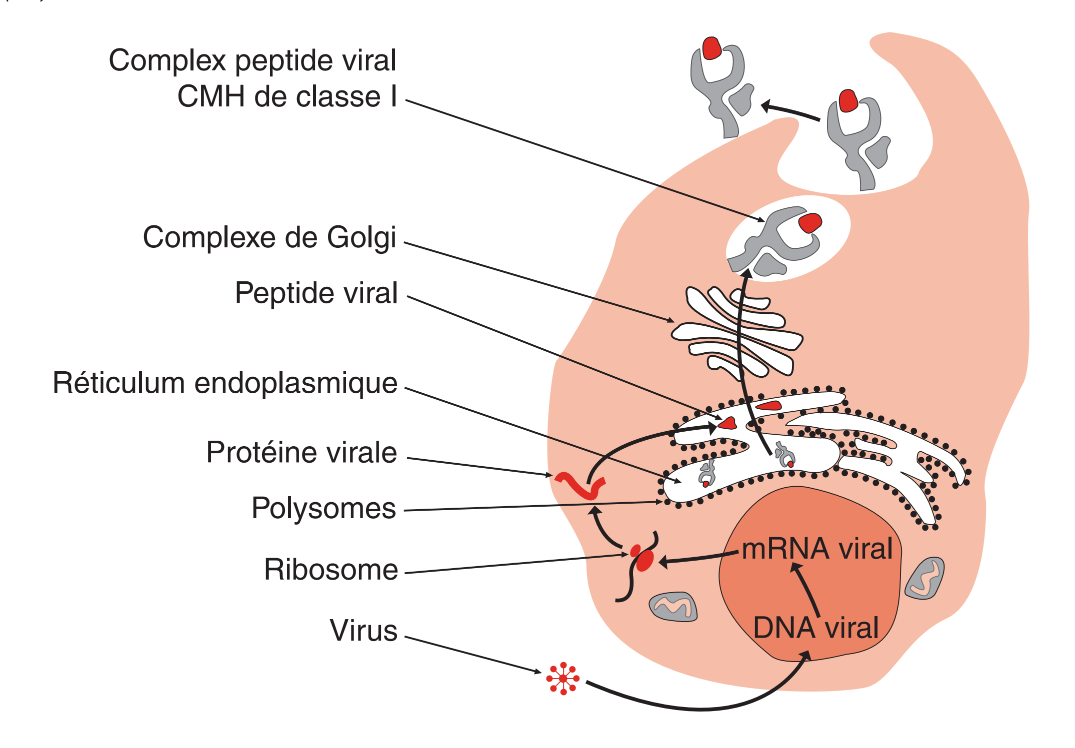
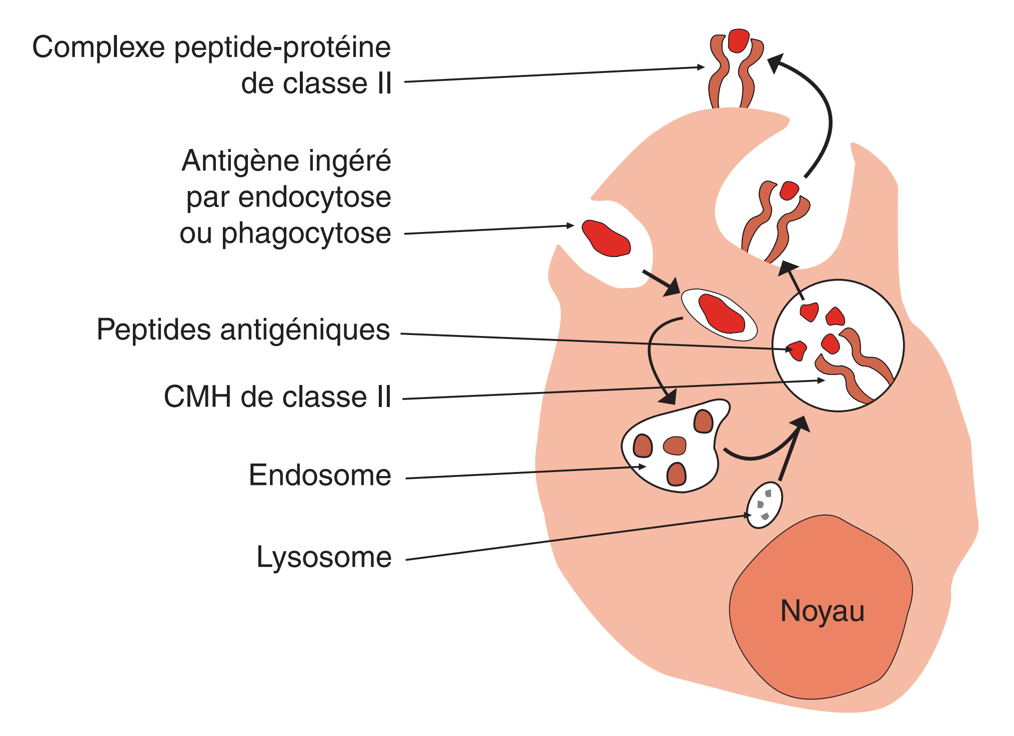


Figure 22.6

(A) Complexe peptide-CMH de classe I présenté à la surface de la cellule



(B) Complexe peptide-CMH de classe II présenté à la surface de la cellule



RÉCEPTEUR DES CELLULES T ET RECONNAISSANCE DES COMPLEXES ANTIGÈNE-CMH

Dans les lymphocytes T, un complexe protéique transmembranaire TCR-CD3 formé de deux éléments, le récepteur des cellules T (TCR, de *T-cell receptor*) et le CD3, assume la reconnaissance spécifique des fragments antigéniques associés à des molécules du CMH ainsi que l'activation qui s'ensuit de signaux intracellulaires. De plus, des corécepteurs (p. 418), CD4 pour les lymphocytes T_H et CD8 pour les lymphocytes T_C, orientent ces cellules vers des cibles spécifiques.

Le TCR *(Figure 22.7A)* des lymphocytes T auxiliaires ou cytotoxiques se présente comme une glycoprotéine transmembranaire hétérodimérique αβ dont les chaînes polypeptidiques TCRα et TCRβ, de 43 kDa chacune, sont unies par une liaison disulfure. Elles ont toutes deux un domaine N-terminal variable V, Vα ou Vβ, et un domaine C-terminal constant C, Cα ou Cβ. La structure tridimensionnelle du TCR a été déterminée *(Figure 22.7B)*. Les domaines variables Vα et Vβ sont structurellement apparentés aux domaines V_H et V_L des chaînes lourdes et des chaînes légères des immunoglobulines (p. 428). De même, des boucles semblables aux CDR des immunoglobulines (p. 428) font protrusion aux extrémités de Vα et de Vβ les plus éloignées de la membrane des lymphocytes T pour former un site de reconnaissance et de liaison de l'antigène présenté dans un complexe peptide-CMH *(Figure 22.7C)*. Les TCR ont, de plus, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. Un petit nombre de lymphocytes T expriment un récepteur constitué d'une chaîne γ et d'une chaîne δ, à la place d'une chaîne α et d'une chaîne β. Les quatre locus α, β, γ et δ des TCR sont organisés dans la lignée germinale de façon très semblable à l'organisation multigénique des gènes des immunoglobulines (p. 434) ; les gènes fonctionnels des TCR sont produits par des réarrangements de segments V et J dans les familles des chaînes α et des chaînes γ et de segments V, D et J dans les familles des chaînes β et des chaînes δ.

Le CD3 *(Figure 22.7D)* est un complexe des cinq chaînes polypeptidiques invariantes qui s'associent pour former trois dimères, γε, δε et ζζ. Le complexe du récepteur des cellules T peut alors être considéré comme un ensemble de quatre dimères : l'hétérodimère des TCR qui détermine la spécificité de la liaison à l'antigène et les trois dimères γε, δε et ζζ qui participent à la transduction du signal.

Figure 22.7

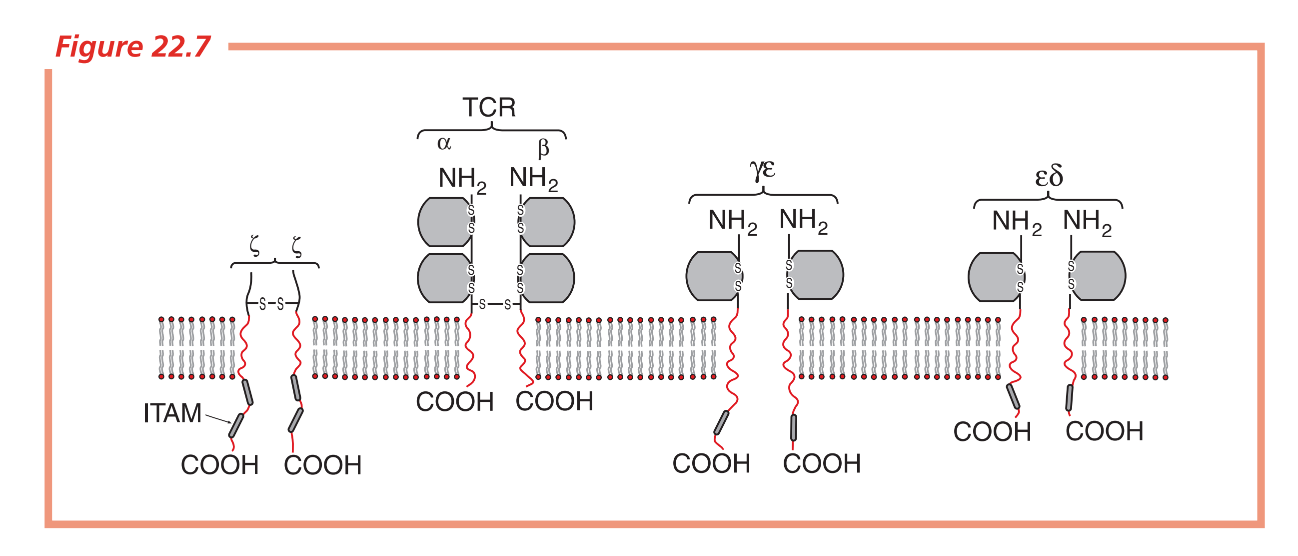


Figure 22.7

(A)

N N
Chaîne α Chaîne β
V_α V_β
C_α C_β
C C
TCR

(B)

1 2 3 3 2 1
V_α V_β
C_β
C_α
TCR

(C)

TCR
C_α C_β
V_α V_β
Peptide antigénique
$\alpha 1$
$\alpha 2$
$\beta_2 m$
CMH de classe I
$\alpha 3$

Complexe peptide-CMH de classe I + TCR

MARQUEURS CD ET PROFIL SPÉCIFIQUE DES LYMPHOCYTES

Les protéines du CMH et les récepteurs des lymphocytes T et des lymphocytes B ne sont pas les seuls marqueurs membranaires des cellules du système immunitaire. De nombreuses autres protéines intégrales sont présentes à la surface de ces dernières. Plus de 200 molécules différentes ont été identifiées ; elles sont habituellement désignées selon la nomenclature CD (de *cluster of differentiation*). Certaines sont spécifiques d'un type de cellules, d'autres apparaissent seulement sur des cellules en cours de différenciation, de prolifération ou d'activation. Chaque population de lymphocytes a un profil spécifique de ses marqueurs de surface.

Ainsi, les lymphocytes T auxiliaires et les lymphocytes T cytotoxiques se distinguent par des CD différents, CD4 et CD8, respectivement, qui jouent le rôle de corécepteur et orientent les lymphocytes vers des cibles cellulaires spécifiques. CD4 *(Figure 22.3B)*, protéine intégrale spécifique des lymphocytes T auxiliaires, est constituée d'une seule chaîne transmembranaire qui possède quatre domaines de type immunoglobulinique. CD4 peut se fixer à la partie constante des protéines du CMH de classe II et donc orienter les lymphocytes T auxiliaires vers des cellules présentant à leur surface un complexe peptide antigénique-CMH de classe II. CD8 *(Figure 22.3B)*, protéine intégrale spécifique des lymphocytes T cytotoxiques, est constituée de deux chaînes transmembranaires unies par une liaison disulfure. Chaque chaîne possède un domaine N-terminal semblable aux domaines variables des immunoglobulines. CD8 peut se fixer au domaine constant α_3 des protéines du CMH de classe I et donc orienter les lymphocytes T cytotoxiques vers des cellules présentant à leur surface un complexe peptide antigénique-CMH de classe I.

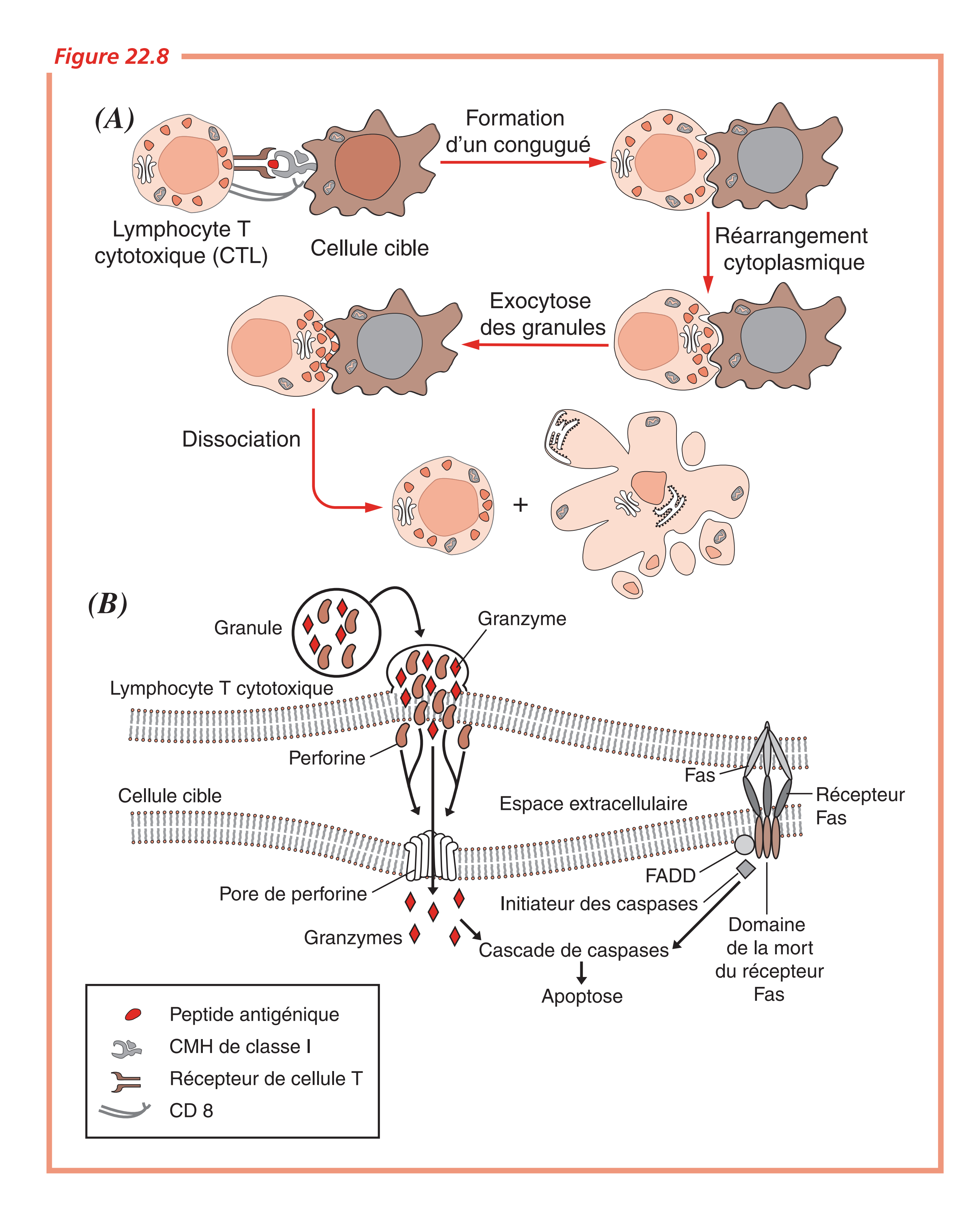
L'étude de la structure des protéines du système CD a permis de comprendre au niveau moléculaire les mécanismes de reconnaissance initiateurs des réponses immunitaires et, dans une certaine mesure, ceux de leur régulation et de leur coordination.

DESTRUCTION DES CELLULES CIBLE PAR LES LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES

Tout d'abord, un complexe membranaire TCR-CD3 d'un lymphocyte Tc naïf reconnaît l'antigène associé à une protéine du CMH de classe I au niveau de la surface d'une cellule cible *(Figure 22.8A)*, ce qui a pour effet de l'activer. Ce lymphocyte devenu fonctionnel détruit alors la cellule cible soit en formant des pores dans sa membrane, soit en déclenchant son apoptose, soit enfin en mettant en œuvre ces deux mécanismes *(Figure 22.8B)*.

Selon un premier mécanisme, les CTL libèrent par exocytose des molécules contenues initialement dans des granules de leur cytoplasme, telles que les monomères d'une protéine susceptible de former des pores et appelée perforine ainsi que diverses sérine protéases appelées granzymes (ou fragmentines) ; ces molécules coopèrent alors pour former des pores de perforine dans la membrane plasmique des cellules cibles et entraîner la destruction de ces dernières.

Selon un second mécanisme, les CTL exposent à leur surface des molécules telles que celle qui se lie au récepteur Fas des cellules cible et déclenche alors l'apoptose, ou mort programmée, de ces dernières.



Ces mécanismes ne sont pas particuliers aux CTL. Les cellules NK (de *Natural Killer*), ou encore cellules naturelles tueuses, qui appartiennent au système immunitaire inné, les mettent elles aussi en œuvre pour détruire les cellules cible du soi infectées ou cancéreuses.

IMMUNOGLOBULINES ET FIXATION DES ANTIGÈNES

Les immunoglobulines sont des protéines susceptibles de reconnaître spécifiquement un antigène, de se lier à ce dernier et donc de le neutraliser. Elles sont localisées sur la membrane plasmique des lymphocytes B ou sécrétées par les plasmocytes dans le milieu intérieur.

Structure en domaines des immunoglobulines

Toutes les immunoglobulines sont formées à partir d'une unité de base constituée de deux copies d'une chaîne lourde H (de *heavy*) et de deux copies d'une chaîne légère L (de *light*), reliées entre elles par des liaisons disulfure, selon le schéma de la *Figure 22.9 ;* elles adoptent une forme en Y. Les chaînes des immunoglobulines sont constituées de domaines d'environ 110 résidus aminoacide ; les chaînes lourdes en ont quatre ou cinq, les chaînes légères deux.

Les domaines N-terminaux des chaînes lourdes H et des chaînes légères L ont des séquences très variables d'une immunoglobuline à l'autre et sont dénommés V_H et V_L, respectivement. La variabilité de la séquence n'est pas la même sur toute la longueur de la chaîne polypeptidique ; elle est particulièrement grande au niveau de trois segments et ces segments hypervariables sont dénommés CDR1, CDR2 et CDR3 (de *complementarity determining region*) car ils déterminent la spécificité de chaque immunoglobuline (p. 00).

Les domaines qui font suite aux domaines variables ont des séquences plus constantes, caractéristiques chacune d'un type de chaîne, et sont dénommés C_H1, C_H2, C_H3, éventuellement C_H4, et C_L. C_H1 et C_H2 sont reliés par une région de la chaîne polypeptidique qui comporte une forte proportion de résidus proline ; elle est donc douée d'une flexibilité qui permet aux deux branches obliques de l'Y de s'écarter ou de se rapprocher l'une de l'autre ou encore de se déplacer par rapport à la branche verticale. Cette région charnière joue un rôle important lors de la réaction antigène-anticorps. Enfin, les domaines C_H2, C_H3 et, éventuellement, C_H4 peuvent être glycosylés.

L'unité de base en forme d'Y des immunoglobulines a une masse moléculaire de 150 kDa environ. Les chaînes lourdes peuvent être clivées au niveau de la région charnière par un enzyme protéolytique, la papaïne ; il y a alors formation de trois fragments de 50 kDa environ. Deux fragments identiques sont constitués des domaines V_H et C_H1 d'une chaîne lourde associée à une chaîne légère par une liaison disulfure. Ils fixent le même antigène que la molécule entière et, pour cette raison, ils sont dénommés Fab (F pour *fragment,* ab pour *antigen-binding*). Le troisième fragment est formé des domaines C_H2 et C_H3 des deux chaînes lourdes, unis par des liaisons disulfure ; il cristallise facilement et, pour cette raison, il est appelé Fc. Il ne fixe pas l'antigène mais il médie les fonctions dites effectrices des immunoglobulines ; entre autres, il permet la fixation du complément et le passage des immunoglobulines maternelles à travers le placenta.

Figure 22.9

Sites de reconnaissance
et de liaison de l'antigène
Extrémités
N-terminales
V_H
Régions
hypervariables
Charnière
C_{H1}
Chaîne
légère L
S
S
S
S
V_L
C_L
Extrémité
C-terminale
S S
C_{H2}
Fab
Fab
Chaîne lourde H
C_{H3}
C_{H4}
Extrémités C-terminales
F_C

Reploiement immunoglobulinique des immunoglobulines

Les domaines constants, qu'ils appartiennent à une chaîne légère ou à une chaîne lourde, sont tous constitués de sept brins β organisés en deux feuillets plissés antiparallèles, l'un de quatre brins, l'autre de trois *(Figure 22.10A)*. Les boucles qui relient les brins entre eux sont courtes. Les feuillets sont étroitement accolés et unis par une liaison disulfure et des interactions hydrophobes entre résidus très conservés. De plus, des résidus situés à la périphérie des feuillets, très conservés eux aussi, établissent des interactions hydrophobes entre les différentes chaînes d'une même immunoglobuline

Les domaines variables, qu'ils appartiennent à une chaîne légère ou à une chaîne lourde, adoptent un reploiement de leur chaîne polypeptidique très semblable à celui des domaines constants, mais le feuillet à trois brins y est remplacé par un feuillet à cinq brins, deux brins supplémentaires étant insérés dans la boucle qui connecte les brins 3 et 4 *(Figure 22.10B)*. Les séquences hypervariables des CDR1, CDR2 et CDR3 se situent dans les boucles qui connectent les brins 2 et 3a, 3b et 3c, 6 et 7. Groupées à l'une des extrémités des feuillets plissés, elles sont proches les unes des autres. La structure des domaines variables est donc celle d'un core qui permet la présentation d'une des zones fonctionnelles des immunoglobulines ; le core est constitué par les deux feuillets plissés antiparallèles de séquence relativement constante, la zone fonctionnelle est formée par les boucles de séquences hypervariables et spécifiques d'une immunoglobuline. Une telle localisation des régions hypervariables est en accord avec la constatation assez générale selon laquelle les sites actifs des protéines sont situés au niveau de boucles (p. 16 et 22).

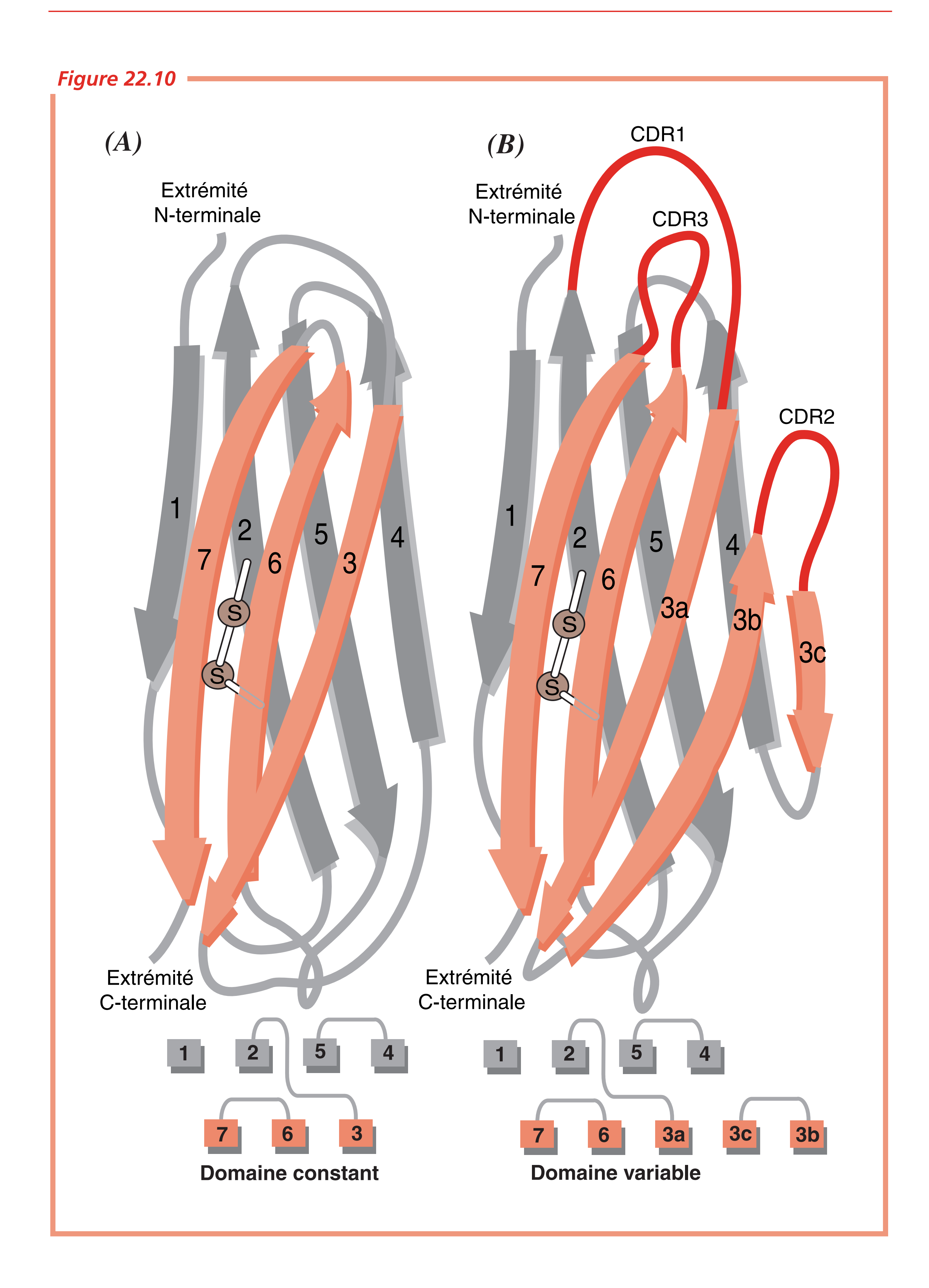
Le motif structural commun aux domaines des immunoglobulines est dénommé reploiement immunoglobulinique ; il caractérise les protéines de la famille des immunoglobulines (p. 418).

Site de reconnaissance et de fixation de l'antigène

La structure du site de reconnaissance et de fixation de l'antigène des immunoglobulines permet de comprendre le mécanisme de la formation du complexe antigène-anticorps et de sa spécificité. Ce site associe C_L à C_H1 et V_L à V_H. et se présente donc comme formé de deux régions constituées, l'une des domaines variables, l'autre des domaines constants, avec les boucles hypervariables à leurs extrémités.

Les domaines constants s'associent étroitement par leurs feuillets à quatre brins, grâce à de nombreuses interactions hydrophobes. Les domaines variables entrent en contact par leurs feuillets à cinq brins, ce qui dispose les six boucles hypervariables en face les unes des autres. Il en résulte la formation d'un site constitué de résidus aminoacide exposés à l'extrémité du fragment Fab, susceptibles de reconnaître spécifiquement un antigène et de se complexer avec lui grâce à des interactions non covalentes. En raison de l'hypervariabilité des séquences des six boucles, un très grand nombre de combinaisons de résidus aminoacide sont possibles, ce qui explique la très grande diversité des sites de fixation de l'antigène, et donc des anticorps.

Figure 22.10


(A)
Extrémité
N-terminale
1
2
7
6
5
3
4
S
S
Extrémité
C-terminale
1
2
5
4
7
6
3
Domaine constant
(B)
CDR1
Extrémité
N-terminale
CDR3
CDR2
1
7
2
6
5
3a
4
3b
3c
S
S
Extrémité
C-terminale
1
2
5
4
7
6
3a
3c
3b
Domaine variable

Les antigènes de faible masse moléculaire, dénommés haptènes, se fixent habituellement dans des crevasses du site de reconnaissance et de fixation de l'anticorps. C'est le cas de la phosphorylcholine qui a été un modèle très utilisé pour l'étude de la réaction antigène-anticorps ; cet haptène se loge dans une cavité d'environ 15 Å de large et de 12 Å de profondeur. Pour les antigènes de masse moléculaire élevée, tels que les protéines, l'interaction entre l'antigène et l'anticorps s'étend sur une surface relativement plane du site de liaison de ce dernier, de 15 × 20 Å environ ; elle ne fait intervenir qu'un nombre restreint de résidus aminoacide de l'antigène qui, ensemble, constituent un épitope ou encore un déterminant antigénique. Une protéine présente habituellement un grand nombre d'épitopes potentiels, à chacun desquels correspond un anticorps spécifique. Un anticorps qui ne reconnaît qu'un épitope est dit monoclonal. Un mélange d'anticorps reconnaissant chacun un épitope différent est dit polyclonal.

Classes des immunoglobulines

Les immunoglobulines sont réparties en cinq classes *(Figure 22.11* et *Tableau 22.1)*. En effet, il existe cinq isotypes de chaînes lourdes, γ, α, μ, δ et ε ; les chaînes lourdes γ, α et δ sont formées de quatre domaines, un variable et trois constants, les chaînes lourdes μ et ε de cinq domaines, un variable et quatre constants. Il y a deux isotypes de chaînes légères, κ et λ, constituées chacune d'un domaine variable et d'un domaine constant. Tous les isotypes de chaînes lourdes, γ, α, μ, δ et ε, peuvent se combiner, tant avec l'isotype de chaîne légère κ qu'avec l'isotype de chaîne légère λ, pour former cinq classes d'immunoglobuline, IgG κ ou λ, IgA κ ou λ, IgM κ ou λ, IgD κ ou λ et IgE κ ou λ, respectivement. Les IgG, IgD et IgE sont des monomères de l'unité de base, les IgA peuvent être des monomères, des dimères ou des polymères et les IgM sont toujours des pentamères ; ces deux dernières classes comportent une chaîne polypeptidique supplémentaire, dite chaîne J. De plus, à l'intérieur des IgG et des IgA, il peut exister des sous-classes dont le nombre est variable d'une espèce à l'autre ; chez l'Homme, il y a quatre sous-classes d'IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, deux sous-classes d'IgA, IgA1 et IgA2. Les chaînes lourdes ont des propriétés et des fonctions différentes, mais il n'y a pas de différences fonctionnelles entre les chaînes légères.

Les IgG sont les immunoglobulines les plus abondantes du sérum sanguin. Elles traduisent la réponse immunitaire secondaire à la plupart des antigènes libres. Les IgG1, IgG2 et IgG3 peuvent se lier au composant C1q du complément et activer la voie classique de ce dernier. Toutes les IgG peuvent fixer les complexes immuns aux récepteurs Fc des neutrophiles et des macrophages et donc se comporter en opsonines.

Les IgM sont les premières immunoglobulines produites au cours du développement. Elles sont aussi les premières immunoglobulines à être synthétisées et sécrétées par les plasmocytes et elles traduisent donc la réponse immunitaire primaire. Elles fixent le complément de façon très efficace.

Les IgA sont les immunoglobulines les plus abondantes dans les sécrétions où elles participent à la lutte contre l'envahissement des cellules par des micro-organismes pathogènes.

Les IgD ont des fonctions encore très peu connues. On sait qu'elles sont exprimées à la surface des lymphocytes B où, avec les IgM, elles semblent jouer aussi le rôle de récepteurs membranaires.

Figure 22.11

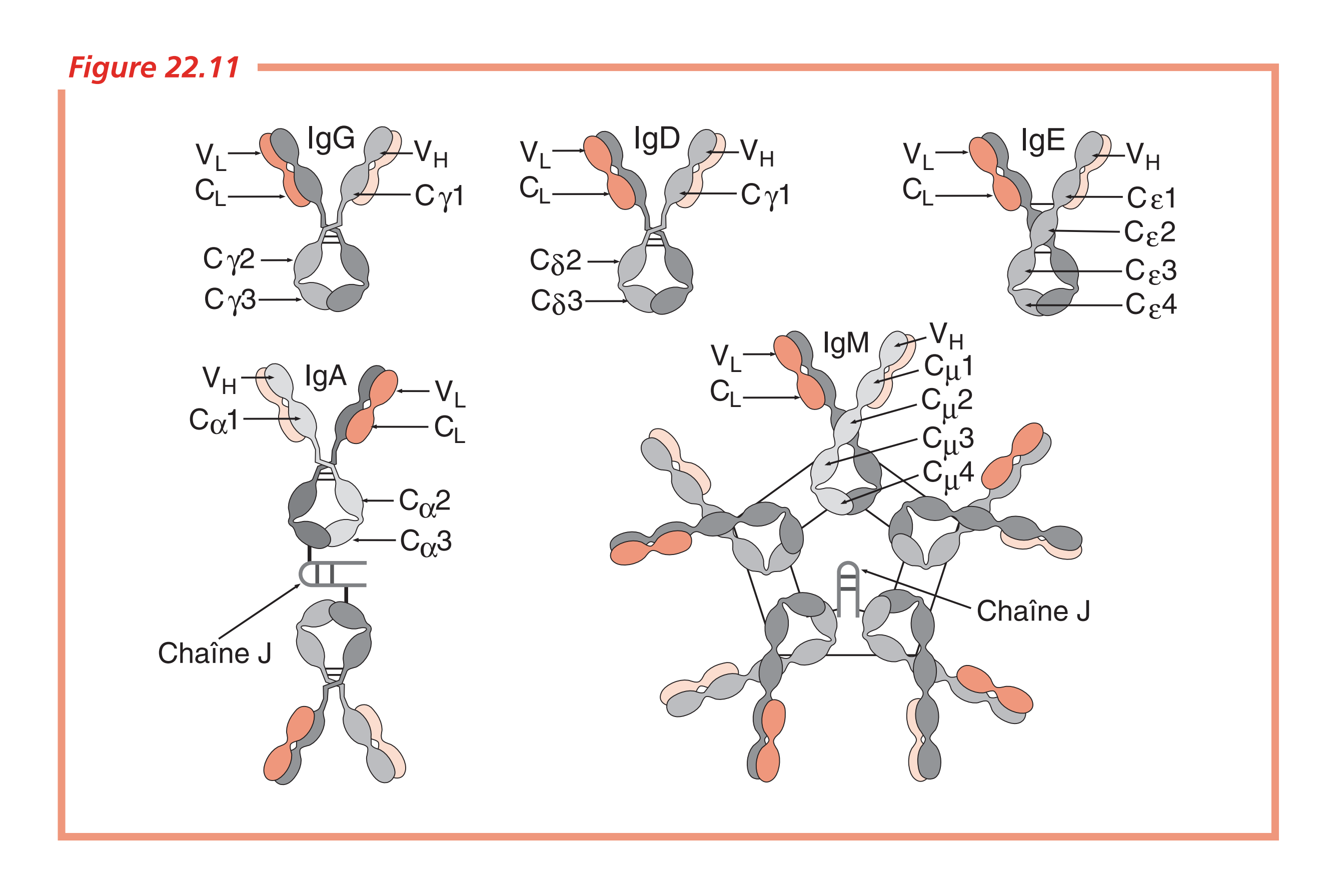


Tableau 22.1

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgM	IgD	IgE
Chaîne lourde	γ1	γ2	γ3	γ4	α1 ou α2	μ	δ	ε
Nombre de domaines de la chaîne lourde	4	4	4	4	4	5	4	5
Masse moléculaire (kd)	150	150	150	150	$(150)_n$	900	150	190
Glucides (%)	2-3	2-3	2-3	2-3	7-11	12	9-14	12
Concentration sérique (gL^{-1})*	8	2	1	0,5	1,8-3	0,8-1	0,05 0,01	0,0001
Activation du complément	+	+/–	++			+++		
Transfert placentaire	+	+/–	+	+				

* La concentration sérique est fonction de l'âge et du sexe ;
les valeurs données ici, à titre d'indication, sont celles d'un jeune adulte mâle.

Les IgE ont une très forte affinité pour les récepteurs Fc des basophiles et des mastocytes. Dans l'hypersensibilité immédiate de type I, observée dans l'asthme et le rhume des foins, un complexe est formé à la surface des mastocytes par un allergène, des IgE spécifiques de cet allergène et des récepteurs Fc. Les mastocytes ainsi activés libèrent de l'histamine et d'autres substances spasmogènes.

Organisation et expression des gènes des immunoglobulines

La détermination de la structure des immunoglobulines montre que chaque molécule d'anticorps est constituée d'une séquence d'aminoacides spécifiques dans sa région variable et d'une séquence appartenant à un nombre limité de séquences invariantes dans sa région constante. Dans le DNA de la lignée germinale, de multiples segments géniques codent pour des parties d'une même chaîne lourde ou d'une même chaîne légère d'immunoglobuline ; ils doivent être réarrangés et recombinés en gènes fonctionnels avant d'être transcrits et traduits en chaînes complètes.

Les familles des chaînes légères κ *(Figure 13.A)* et λ contiennent des segments géniques V, J et D ; les segments VJ réarrangés codent pour la région variable des chaînes légères. La famille des chaînes lourdes *(Figure 13.B)* contient des segments géniques V, D, J et C ; les segments géniques réarrangés codent pour la région variable des chaînes lourdes. Dans chaque famille, les segments géniques C codent pour les régions constantes. Chaque segment génique V est précédé à son extrémité 5' d'un petit exon qui code pour un court peptide signal ou leader (L) qui guide la chaîne légère ou la chaîne lourde à travers le réticulum endoplasmique.

Figure 22.12

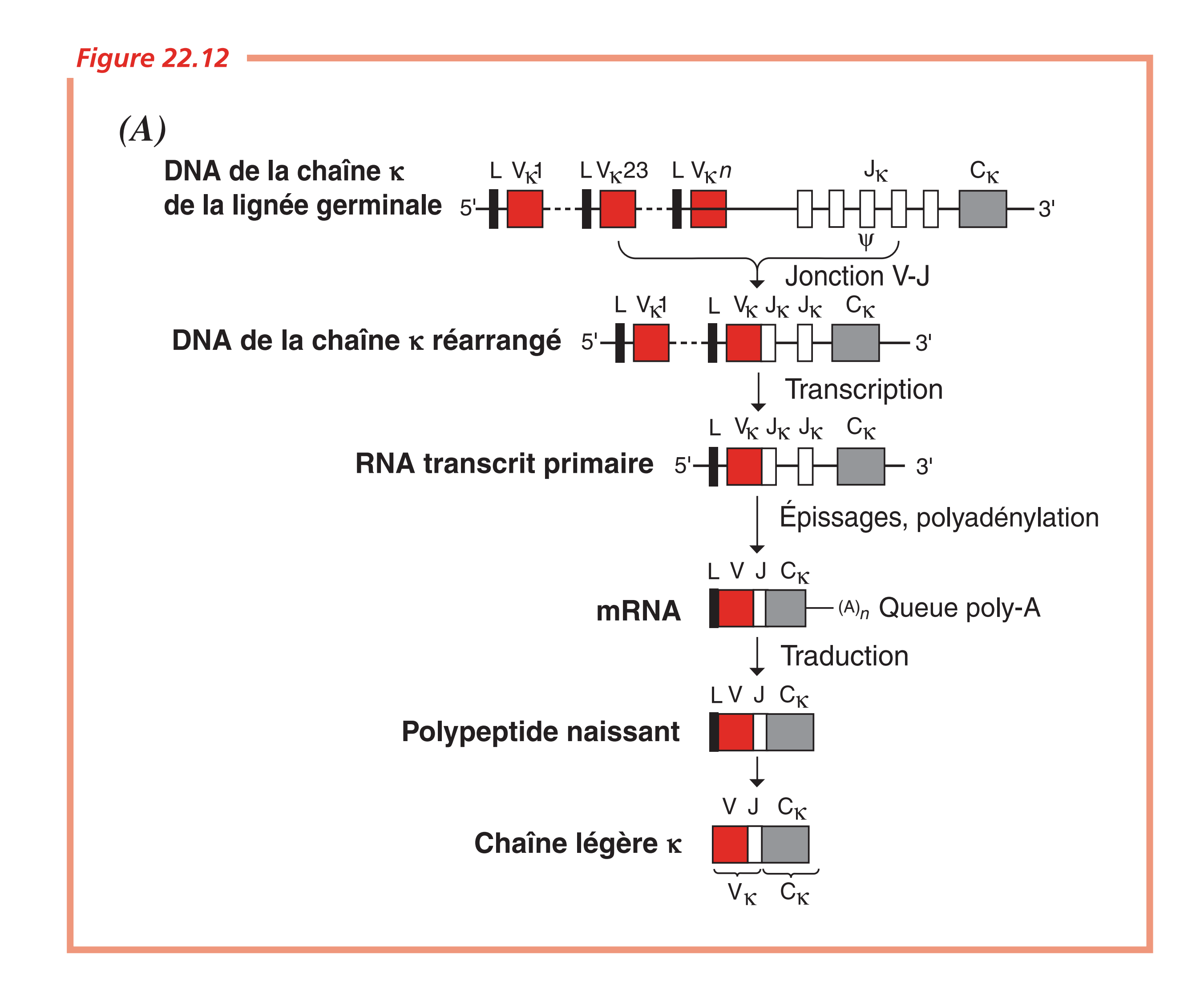
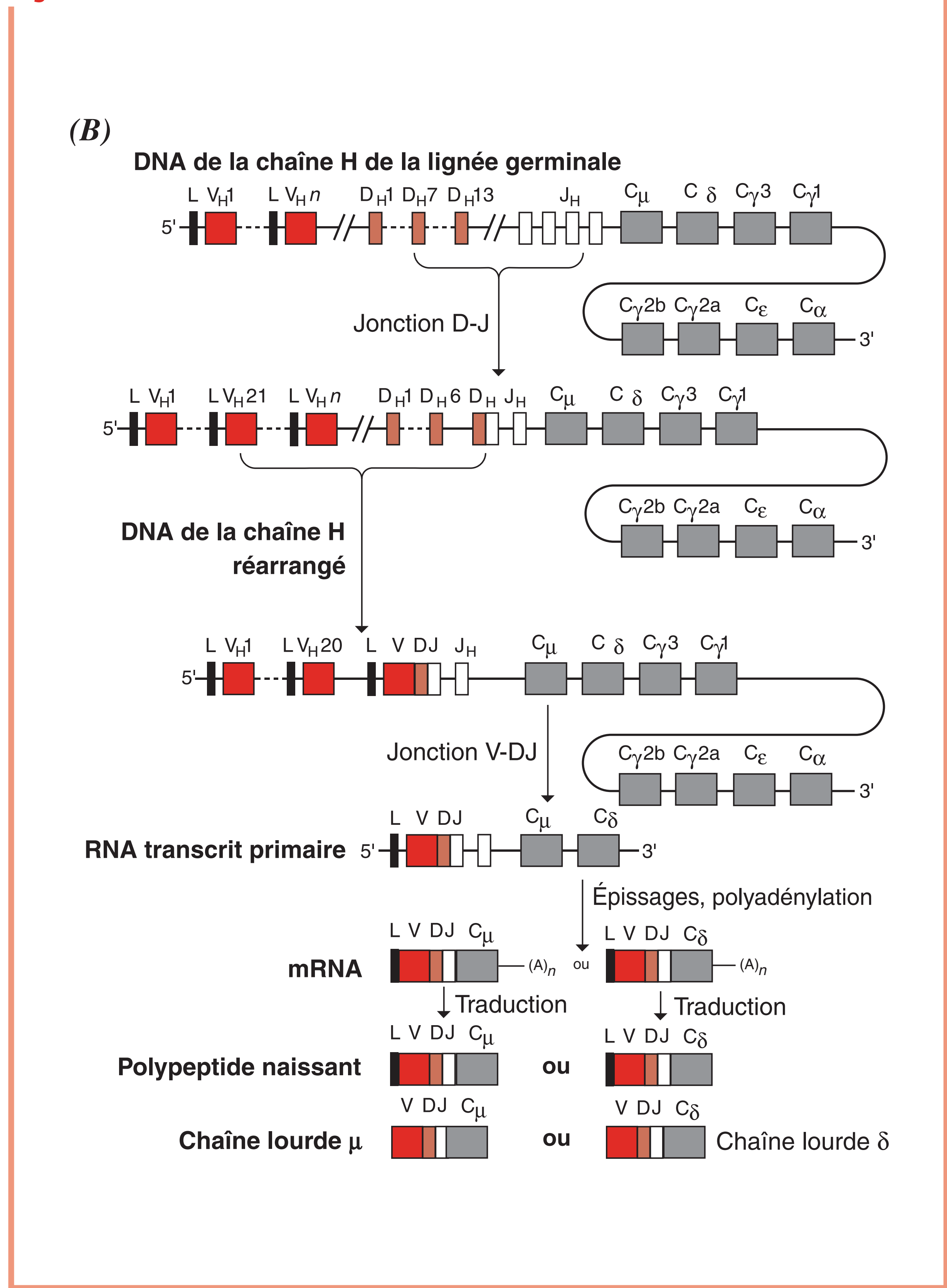


Figure 22.12


(B)
DNA de la chaîne H de la lignée germinale
L VH1 L VHn DH1 DH7 DH13 JH Cμ Cδ Cγ3 Cγ1
5'
Cγ2b Cγ2a Cε Cα
3'
Jonction D-J
L VH1 L VH21 L VHn DH1 DH6 DH JH Cμ Cδ Cγ3 Cγ1
5'
Cγ2b Cγ2a Cε Cα
3'
DNA de la chaîne H réarrangé
L VH1 L VH20 L V DJ JH Cμ Cδ Cγ3 Cγ1
5'
Jonction V-DJ
Cγ2b Cγ2a Cε Cα
3'
RNA transcrit primaire
L V DJ Cμ Cδ
5'
3'
Épissages, polyadénylation
mRNA
L V DJ Cμ
(A)n
ou
L V DJ Cδ
(A)n
Traduction
Traduction
Polypeptide naissant
L V DJ Cμ
ou
L V DJ Cδ
Chaîne lourde μ
V DJ Cμ
ou
V DJ Cδ
Chaîne lourde δ

Immunoglobulinopathies

Les immunoglobulines peuvent être étudiées par de très nombreuses techniques dont la présentation sortirait du cadre de cet ouvrage. Disons que dans une approche préliminaire, les immunoglobulines sériques peuvent être analysées très simplement, qualitativement et quantitativement, par électrophorèse et par immunoélectrophorèse. L'électrophorèse sur un support tel que l'acétate de cellulose permet de séparer les protéines sériques en plusieurs fractions : sérum albumine, α-globulines, β-globulines et γ-globulines qui peuvent être visualisées par un colorant ; l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration *(Figure 22.12A)*. Les immunoglobulines sont, pour la plupart, dans la fraction γ-globulinique. Dans une immunoélectrophorèse, la séparation est réalisée dans un gel d'agarose où une protéine peut être révélée sélectivement par un anticorps spécifique avec lequel elle précipite. Ainsi, l'utilisation d'anticorps qui ne reconnaissent qu'une chaîne lourde γ, α, μ, δ ou ε, ou qu'une chaîne légère κ ou λ, permet de caractériser très simplement une immunoglobuline monoclonale *(Figure 22.12B)*.

À l'état physiologique, la concentration des différentes immunoglobulines sériques est comprise entre certaines limites *(Tableau 22.1)*. Des taux qui se situent en dehors de ces bornes traduisent un état pathologique. Ainsi, une hypoimmunoglobulinémie portant sur l'ensemble des immunoglobulines ou sur une classe d'immunoglobuline est observée dans de nombreuses affections : agammaglobulinémie de Bruton, déficit sélectif d'IgA, ataxie télangiectasique, syndrome de Wiscott-Aldrich, immunodéficience commune. Une hyper-immunoglobulinémie peut être associée à une réaction inflammatoire chronique ou à une cirrhose hépatique *(Figure 22.12A)*.

Des immunoglobulines monoclonales IgG *(Figure 22.12B)*, IgA, plus rarement IgD ou IgE, sont souvent révélatrices d'un myélome multiple des os, ou maladie de Kahler. Chez les patients atteints de cette affection, des plasmocytes néoplasiques de la moelle osseuse sécrètent en abondance des immunoglobulines complètes et, dans un certain nombre de cas, des chaînes légères libres qui sont éliminées dans les urines où elles sont connues sous la dénomination de protéine de Bence Jones. Des immunoglobulines monoclonales IgM pentamériques, sécrétées en quantités importantes, parfois supérieures à 100 g L^{-1}, par des lymphoplasmocytes, population assez hétérogène de cellules moins différenciées que les plasmocytes, sont très symptomatiques d'une macroglobulinémie de Waldenström. Chez les patients atteints des maladies de Kahler ou de Waldenström, la synthèse des autres immuno-globulines est très diminuée.

Dans la maladie dite des chaînes lourdes, ces dernières sont sécrétées par des plasmo-cytes non néoplasiques. Elles ont une structure anormale et sont plus courtes que les chaînes lourdes normales. Elles ne peuvent pas s'associer à des chaînes légères et sont retrouvées à l'état libre dans le sérum sanguin, d'où le nom de la maladie.

Figure 22.13

* ASP : antisérum polyvalent

Index

B

C

D

E

F

G

H

K

L

M

N

O

P

U

V

X, Z

